DNA-Replikation in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen: Faserautoradiographische Untersuchungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Renate Blütters
aus Schwerte

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523714_0042

DNA-Replikation in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen: Faserautoradiographische Untersuchungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Renate Blütters

aus Schwerte

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.6.1978

Dekan : Prof. Dr. W. Zeil

1. Berichterstatter : Prof. H. Probst

2. Berichterstatter : Prof. U. Weber

A B S T R A C T

Blütters, Renate

DNA-Replikation in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen:
Faserautoradiographische Untersuchungen

Die Organisation der DNA-Replikation in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen wurde an asynchronen und synchronen Populationen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Der Abstand der Initiationspunkte beträgt je nach Wachstumsbedingungen 53,6 bis 76,7 µm. Die Größe der Replikationseinheiten ändert sich im Verlauf der S-Phase nicht.

2) Die Replikationsgeschwindigkeit beträgt bei asynchronen Kulturen 0,59 bis 0,79 µm/min x Gabel. Im Verlauf der S-Phase in vitro nimmt sie bei synchronen Kulturen von 0,75 auf 0,91 µm/min x Gabel zu, in vivo bleibt sie mit Werten von 1,13 bis 1,20 µm/min x Gabel konstant.

3) Es besteht eine Korrelation zwischen der Größe und der Replikationsgeschwindigkeit einer Replikationseinheit.

4) Die Regulation der DNA-Synthese erfolgt auf der Ebene von Gruppen benachbarter Replikationseinheiten (Cluster).

5) Die einzelnen Replikationseinheiten sind nicht fest gegeneinander abgegrenzt.

Für meine Eltern

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. H. Probst

am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Probst möchte ich an dieser Stelle für die Zuweisung des Themas, seine intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion dieser Arbeit, sowie seine großzügige Förderung danken.
Herrn Prof. Dr. M. F. Rajewsky, Institut für Zellbiologie Universität Essen, und seinen Mitarbeitern danke ich für die Durchführung der impulscytofluorometrischen Messungen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1	Material	5
2.1.1	Zellmaterial	5
2.1.2	Medien	5
2.1.3	Radioaktiv markierte Substanzen	6
2.1.4	Chemikalien und sonstige Hilfsmittel	6
2.2	Methoden	7
2.2.1	Zellentnahme	7
2.2.2	Selektion synchroner Populationen	7
2.2.3	Anlegen und Charakterisierung synchroner Kulturen	7
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl und des mitotischen Index	8
2.2.5	Markierung der Zellen	8
2.2.6	Aufarbeitung der markierten Zellen	10
2.2.7	Radioaktivitätsmessungen	11
2.2.8	Auswertung der Autoradiographien	12
2.2.8.1	Technik	12
2.2.8.2	Auswertung	12
3.	Ergebnisse und Diskussion	18
3.1	Methodik	18
3.1.1	Thymidin-Einbau in vitro, Einfluß von 5-Fluordesoxyuridin	18
3.1.2	Thymidin-Einbau-Kinetik in vivo	20
3.1.3	Zellkinetische Daten	22
3.1.3.1	Dauerkultur	22
3.1.3.2	Synchrone in vitro Kulturen	23
3.1.3.3	Markierung in vivo und Auftrennung nach S-Phase-Stadien	24
3.2	Faserautoradiographische Befunde	29
3.2.1	Interinitiationsabstände	29
3.2.1.1	Fehlerquellen	29

Seite

3.2.1.2	Interinitiationsabstände asynchroner Kulturen	30
3.2.1.3	Interinitiationsabstände im Verlauf der S-Phase bei synchronen Kulturen	34
3.2.1.4	Interinitiationsabstände im Verlauf der S-Phase in vivo	37
3.2.1.5	Variationen der Interinitiationsabstände innerhalb einer Gruppe benachbarter Replikationseinheiten	40
3.2.2	Replikationsgeschwindigkeit	44
3.2.2.1	Replikationsgeschwindigkeit asynchroner Zellen	44
3.2.2.2	Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase bei synchronen Kulturen	46
3.2.2.3	Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase in vivo	47
3.2.2.4	Variationen der Replikationsgeschwindigkeit innerhalb einer Gruppe benachbarter Replikationseinheiten	50
3.2.2.5	Variation der Replikationsgeschwindigkeit mit der Größe der Replikationseinheit	53
3.2.3	Synchronität der Initiation in Gruppen benachbarter Replikationseinheiten	57
3.2.4	Sollhaltepunkte	59
3.3	Modell der DNA-Replikation bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen	61
4.	Zusammenfassung	68
5.	Literaturverzeichnis	70

Abkürzungen

i.p.	intraperitoneal
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PBS_{def}	phosphate buffered saline ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}-Salze
dThd	Thymidin
FdUrd	5-Fluor-2'-desoxyuridin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Di-Na-Salz
TCA	Trichloressigsäure
Ipm	Impulse pro Minute
Zpm	Zerfälle pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure

1. Einleitung

Seit Huberman und Riggs 1968 (1) auf Grund von Faserautoradiographien ihr bidirektionales Modell für die DNA-Replikation vorgeschlagen haben, ist dieses von vielen anderen Autoren mit leicht abgewandelten Methoden in seinen Grundzügen bestätigt worden. Das Modell (Abb. 1) schlägt vor, daß die DNA von bestimmten Initiationspunkten ausgehend bidirektional durch zwei sich voneinander fortbewegende Gabeln repliziert wird. Die so entstehenden DNA-Doppelstrang-Paare bilden Blasen oder Schleifen, die miteinander zu größeren Blasen verschmelzen, bis die gesamte DNA repliziert ist.

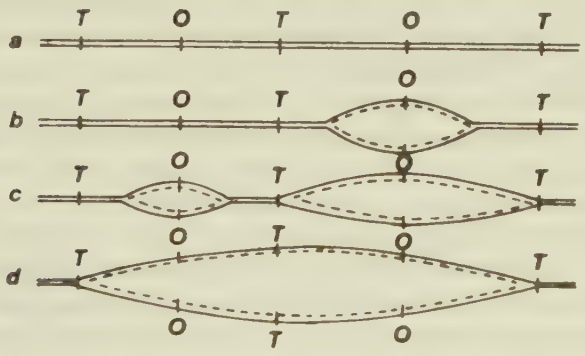


Abb. 1: Wiedergabe nach Huberman und Riggs (1):
Bidirektionales Modell der DNA-Replikation
——— Parentalstrang, ----- Tochterstrang,
O Initiationspunkt, T Terminationspunkt
a) Vor der Replikation
b-d) Verschiedene Stadien der Replikation
b) Replikation in der rechten Replikationseinheit
c) Replikation in der linken Einheit, Replikation in der rechten Einheit an Terminationspunkten beendet.
d) Replikation in beiden Einheiten abgeschlossen, die Tochterdoppelhelices haben sich am gemeinsamen Terminationspunkt getrennt.

Inzwischen sind die Teilaspekte dieses Modells an vielen Säugetierzellen überprüft worden. Es liegen genauere Untersuchungen über die Größe der Replikationseinheiten vor. Die Mittelwerte variieren von 17 µm bei Rinderzellen (2) bis 84 µm bei Mäusefibroblasten (3), die Streuung ist im allgemeinen sehr breit.
Die Replikationsgeschwindigkeit, die Geschwindigkeit, mit der sich eine Replikationsgabel vom Initiationspunkt fortbewegt, ist ebenfalls sehr unterschiedlich. Die meisten Autoren geben für Säugetierzellen Mittelwerte zwischen 0,5 und 1,8 µm/Min x Gabel an (1,4).
Ein anderes wesentliches Merkmal liegt darin, daß die Größe der Replikationseinheiten von vorneherein feststehen soll. An ihren Enden sollen sogenannte Sollhaltepunkte existieren, die von einer Replikationsgabel nicht überschritten werden. Bisher liegen nur wenig Untersuchungen darüber vor, ob es diese Sollhaltepunkte gibt oder ob die Replikationsgabeln beim Aufeinandertreffen einfach miteinander verschmelzen. Aus faserautoradiographischen Untersuchungen von DNA aus Mäuse- und Geflügelzellen (5,6) ergaben sich keine Hinweise für die Existenz solcher Sollhaltepunkte.
Aus Untersuchungen über die DNA-Replikation durch faserautoradiographische Methoden kann man auch Rückschlüsse auf die Regulation ziehen. Als regulierte Größen kommen die Replikationsgeschwindigkeit, die Länge der Replikationseinheiten und die Zahl der aktivierten Einheiten in Frage.

Mehrere Autoren haben in den letzten Jahren Schwankungen der Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase festgestellt. Housman und Huberman (7) fanden bei CHO-Zellen eine Zunahme der Replikationsgeschwindigkeit um das Dreifache, die Größe der Replikationseinheiten blieb konstant. Painter und Schaefer zeigten an HeLa-Zellen, daß sich die Replikationsgeschwindigkeit innerhalb der S-Phase verdoppelt, gleichzeitig aber auch die Zahl der gerade replizierenden Einheiten zunimmt (8). In diesem Zusammen-

hang sind auch die Untersuchungen von Taylor und Hozier (9) interessant, die fanden, daß Initiationsstellen auf dem DNA-Doppelstrang im Abstand von 4 µm voneinander lokalisiert sind. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Blumenthal et al. (10) und Wolstenholme (11), die viele eng benachbarte Initiationsstellen bei embryonalen Zellen von Drosophila melanogaster nachgewiesen haben. Sie schlagen vor, daß bei normalen, differenzierten Zellen immer nur ein Teil davon aktiviert wird und so die von anderen Autoren gefundenen größeren Replikationseinheiten entstehen. Das bedeutet aber, daß die Regulation der DNA-Synthese zumindest im Verlauf der Differenzierung über die Größe der Replikationseinheiten erfolgt.
Eine Variation in der Zahl der replizierenden Einheiten könnte nicht nur durch eine Änderung der Abstände der Initiationspunkte erfolgen, sondern auch dadurch, daß unterschiedlich große Gruppen von Replikationseinheiten durchschnittlicher Größe aktiviert werden. Hand und Tamm (2) zeigten, daß die DNA-Replikation innerhalb eines Stranges benachbarter Einheiten fast synchron initiiert wird. Bei näherer Untersuchung fand Hand (5), daß die Initiation bei zwei benachbarten Replikationseinheiten in 80 % innerhalb eines Zeitraums von 30 Minuten erfolgt. Die Synchronität ist zwar nicht vollständig, die Ergebnisse weisen aber darauf hin, daß die Aktivierung einer Gruppe von Replikationseinheiten zu etwa demselben Zeitpunkt ein Prinzip der Regulation der DNA-Replikation sein könnte.

Bei einem im hiesigen Labor gehaltenen Stamm von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen kann durch adäquate Wahl der äußeren Bedingungen der Zellzyklus und insbesondere die Dauer der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) beeinflußt werden. Darüberhinaus besteht bei diesem Stamm die Möglichkeit, durch Selektion (Zonal-Zentrifugation) synchrone Populationen aus verschiedenen Abschnitten der S-Phase zu erhalten. Durch diese Eigenschaften liegen bei diesem Zellstamm äußerst günstige Voraussetzungen vor, die angesprochenen Regula-

tionsvorgänge durch DNA-Faserautoradiographie zu untersuchen. Diese Studien sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Fragestellung hat dabei zwei Schwerpunkte:

A) Es sollten Daten gewonnen werden, die teils als Basis für die Konstruktion eines Computermodells der Organisation der DNA-Replikation (12) gebraucht wurden, teils zur Überprüfung von Voraussagen aus der statistischen Durchrechnung solcher Modelle geeignet sind.

B) Es sollte der Frage nach der Änderung der Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase nachgegangen werden, ohne das Wachstum der Zellen vor oder während der Markierung durch irgendwelche Synchronisationsmaßnahmen zu beeinflussen. Als Versuchssystem boten sich Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in der Peritonealhöhle der Versuchstiere an, die unter natürlichen Bedingungen markiert und danach zur Gewinnung der gewünschten Daten durch Zonal-Zentrifugation nach Zellzyklusphasen aufgetrennt werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellmaterial

Bei den für diese Untersuchungen verwendeten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen handelt es sich um einen sowohl in vivo als auch permanent in vitro züchtbaren Stamm (13). Die Haltung in vivo erfolgt durch i.p. Injektion von 0,2 ml eines 7 Tage alten Aszites bei weiblichen NMRI-Mäusen von 20 bis 25 g (Züchtung: Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover). Für die Versuche wurden Zellen vom 4. Tag nach der Inokulation verwendet, die sich dann in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (14).

2.1.2 Medien

Kulturmedium
Die Herstellung und Aufbewahrung des Kutlurmediums nach Schindler et al. (15) erfolgte nach (16).
Heparinisiertes Medium
5 USP-Einheiten Liquemin^{R} (Hoffmann LaRoche, Grenzach) werden pro ml Kulturmedium zugesetzt.
Hanks-Lösung (17)
PBS (Phosphate Buffered Saline) (17)
8,0 g NaCl, 0,20 g KCl, 0,1 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgCl_2 \times 6\ H_2O$, 1,15 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$, 0,2 g KH_2PO_4 ad 1000 ml.
PBS def: PBS ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2 \times 6\ H_2O$
Lyse-Medium (18)
PBS def mit 1 % SDS (Natrium-Dodecylsulfat), 0,01 M EDTA
Aceto-Orcein-Lösung (17)
Material für Zonal-Zentrifugation (19)

2.1.3 Radioaktiv markierte Substanzen

Methyl-^{3}H-Thymidin 40-50 Ci/mMol
2-^{14}C-Thymidin 56 mCi/mMol
(beides Amersham Buchler, Braunschweig, oder NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain)
Methyl,1',2'-^{3}H-Thymidin 100 Ci/mMol (NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain)
^{3}H-Toluol mit Toluol verdünnt auf 1 x 10^{6} Zpm/0,1 ml
^{14}C-Toluol mit Toluol verdünnt auf 1 x 10^{5} Zpm/0,1 ml
(beides Amersham Buchler, Braunschweig)

2.1.4 Chemikalien und sonstiges Material

Toluolszintillator: 5 g 2,5-Diphenyloxazol, 0,2 g 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol (beides Merck, Darmstadt) gelöst in 1000 ml dest. Toluol
Hydroxide of Hyamine^{R} 10-X (Packard, Frankfurt)
Glasfaserfilter GF/C (Whatman, Balston, England)
Nuclear-Research-Emulsion K5 (Ilford, England)

Photomaterial
Kodak D 19 Entwickler in Pulverform (Kodak Ltd., London, England)
Tetenal Express-Fixiersalz (Tetenal, Hamburg, Berlin)
Emofin Zweistufen-Feinstkornentwickler (Tetenal, Hamburg, Berlin)
Neutol Liquid NE Konzentrat (Agfa-Gevaert, Leverkusen)
Ilford Pan F (Ilford, England)
Agfa Copyline P 90, Din A3 (Agfa-Gevaert, Leverkusen)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellentnahme

Zur Zellentnahme wird die Maus durch Genickbruch getötet. Das Fell über dem Bauch wird aufgerissen und 1-2 ml auf 37°C vorgewärmtes, heparinisiertes Medium i.p. injiziert. Die Zellsuspension wird mit einer Einmalspritze abgezogen und für das Anlegen einer Kultur in auf 37°C vorgewärmtes Medium gegeben. Das Anlegen und die Fortführung von Kulturen ist bei Schindler et al. (15) und Wurster (20) ausführlich beschrieben.

2.2.2 Selektion synchroner Populationen

Durch Zentrifugation in einem Rohrzuckergradienten von 2-31 % Sucrose (2 % Sucrose (w/v) in Hanks-Lösung, die 7,6 g NaCl/l enthält und 31 % Sucrose (w/v) ohne NaCl) werden die Zellen entsprechend ihrer Größe und Dichte, die im Verlauf des Zellzyklus von der G_1- über die S- zur G_2-Phase zunehmen, aufgetrennt. Die Zentrifugation erfolgt im Zonalrotor Typ A der Mistral 6E Zentrifuge bei 4°C. Zur Anlage von synchronen Kulturen führt man die Selektion unter sterilen Bedingungen durch. Der Ablauf der Zonal-Zentrifugation und die Charakterisierung des gewonnenen Zellmaterials ist bei Maisenbacher (16) und Probst und Maisenbacher (14) beschrieben.

2.2.3 Anlegen und Charakterisierung synchroner Kulturen

Zellen aus einer oder zwei benachbarten Fraktionen werden in 200 ml Kulturmedium abzentrifugiert, um den Rohrzucker zu entfernen (5 min bei 500g und 37°C). Die Neueinsaat er-

folgt mit ca. 5 x 10^5 Zellen/ml. Bei längerer Versuchsdauer wird das Medium zur Konstanthaltung der Zellzahl mit frischem, vorgewärmten Medium verdünnt, und diese Verdünnung bei der Berechnung der Zellzahl für Wachstumskurven berücksichtigt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl und des mitotischen Index

Die Zellzahl wird unter dem Phasenkontrastmikroskop in der Neubauer Zählkammer bestimmt.
Zur Bestimmung des mitotischen Indes werden die Zellen nach Schindler et al. (21) fixiert und angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Der mitotische Index (% der sich in Mitose befindlichen Zellen einer Population) wird an 400 Zellen bestimmt.

2.2.5 Markierung der Zellen

Markierung in vitro

Die Markierung in vitro erfolgte abgewandelt nach Hand und Tamm (2).
Ein Versuch wurde in Anwesenheit von 5-Fluordesoxyuridin (2 x 10^{-6} M) ausgeführt, das 0,5 Std. vor der Markierung der Kultur zugegeben wurde. Die anderen Versuche erfolgten ohne 5-Fluordesoxyuridin. ^{3}H-Thymidin der spezifischen Aktivität von 46-52 Ci/mMol wurde zur Trockene eingedampft und mit Hanks-Lösung wieder aufgenommen, um das Inkubationsmedium von 1 ml nicht zu stark zu verdünnen und den osmotischen Druck zu erhalten. Die Markierung erfolgte nach zwei verschiedenen Schemata, die im folgenden mit "heiß/warm" und "warm/heiß" bezeichnet werden.

Markierungsschema "heiß/warm": Thymidin-Konzentration im

Medium 1 x 10^{-6} M (ca. 50 Ci/mMol) 30 min, dann 1,1 x 10^{-5} M (ca. 5 Ci/mMol) 30 min. Der Wechsel der spezifischen Aktivität erfolgte durch Zugabe einer 10-fachen Menge an nicht markiertem Thymidin in vorgewärmter Hanks-Lösung.

Markierungsschema "warm/heiß": Die Markierungszeiten betrugen je nach Versuch je 20 oder 30 min in "warmem" oder "heißem" Thymidin-Medium. Die ^{3}H-Thymidin-Konzentrationen waren 1 x 10^{-7} M (ca. 50 Ci/mMol) für den warmen Puls und 1 x 10^{-6} M (ca. 50 Ci/mMol) für den heißen Puls.
Das Stoppen des Einbaus erfolgte durch Eingießen der Zellsuspension in die 10-fache Menge eiskalter Hanks-Lösung.

Markierung zur Bestimmung der Zellzyklusdaten der Permanentkultur

Die Zellkultur wurde 2 Std. nach Neueinsaat 20 min mit 0,4 x 10^{-8} M ^{3}H-Thymidin (ca. 50 Ci/mMol) inkubiert, bei 500 g abzentrifugiert, 2 mal mit vorgewärmtem Medium gewaschen und erneut mit einer Zelldichte von 54 x 10^{5} Zellen/ml eingesät.

Markierung in vivo

Die Markierung in vivo erfolgte durch i.p. Injektion von je 500 µCi ^{3}H-Thymidin (100 Ci/mMol) im Abstand von 15 min. Nach 24 min wurde die Maus durch Genickbruch getötet, nach 25 min der Einbau durch Entnahme der Zellen und Einspritzen in 100 ml eiskalte Hanks-Lösung gestoppt. Sie wurden 5 min bei 500 g abzentrifugiert und der Auftrennung durch Zonal-Zentrifugation (s. 2.2.2) unterworfen.

Markierung zur Bestimmung der Chase-Zeit von Thymidin in vivo

Um eine Bezugsgröße für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in säureunlösliches Material zu erhalten, wurde die DNA einer Maus vormarkiert. Dazu wurde einer Maus mit einem drei Tage alten Aszites 22 Std. und 2 Std. vor Versuchsbeginn je 10 µCi ^{14}C-Thymidin (56 mCi/mMol) i.p. injiziert. Für die

Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in vivo wurden derselben Maus 100 µCi ^{3}H-dThd (46 Ci/mMol) i.p. injiziert und zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion ein Zellaliquot entnommen. In diesem wurde der Einbau von ^{3}H-Thymidin bezogen auf die konstante Größe des bei der Vormarkierung in die DNA eingebauten ^{14}C-Thymidin bestimmt.

2.2.6 Aufarbeitung der inkubierten Zellen

Faserautoradiographie

Nach dem Stoppen der Inkubation mit eiskalter Hanks-Lösung wurden die weiteren Arbeitsgänge im Eisbad und im Kältelabor ausgeführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 500 g abzentrifugiert, 2 mal mit je 5 ml eiskalter Hanks-Lösung gewaschen und nach der letzten Zentrifugation der Rückstand in PBS def (PBS ohne Ca- und Mg-Salze) wieder aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf 100 000 - 150 000 Zellen/ml eingestellt und zur Überprüfung des Einbaus genau bestimmt. 100 oder 50 µl dieser Zellsuspension wurden auf ein Ende eines mit Gelatine bezogenen Objektträgers gegeben und daneben die gleiche Menge Lysemedium. Die beiden Tropfen wurden mit einem Glasstab vorsichtig verrührt und die lysierten Zellen mit dem Glasstab langsam über den Objektträger gezogen. Diese wurden an der Luft getrocknet, 2 mal je 5 min in eiskalter 5 %iger TCA gewaschen, 3 min in 95 % Äthanol gespült und für die Autoradiographie getrocknet. Die Objektträger wurden wie früher beschrieben mit Ilford K5 Nuklearemulsion überzogen (22), getrocknet und in einem lichtdichten Behälter mit Trockenmittel bei 4°C 2-12 Monate exponiert.

Zur Auswertung wurden die Objektträger bis zu 12,5 min mit Kodak D19 Entwickler entwickelt. Die Entwicklung wurde durch Eintauchen in ein Stoppbad von 2 % Essigsäure beendet. Anschließend wurde 10 min fixiert. Nach dem Wässern und Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Objektträger

für die Mikroskopie getrocknet.

Bestimmung des Markierungsindex

Bei den Versuchen mit in vivo markierten und dann selektionierten synchronen Populationen wurde der Markierungsindex bestimmt. Ein Teil der gewaschenen Zellen wurde auf einen Objektträger gegeben und verteilt. Nach dem Trocknen wurde eine Orcein-Färbung (22) vorgenommen und die Objektträger mit Nuklearemulsion überzogen. Nach drei Wochen Expositionsdauer wurden sie entwickelt (5 min) und fixiert (10 min) und der Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt.

Markierte-Mitosen-Kurve

Die Aufarbeitung der Zellen der Dauerkultur für die Analyse der Zellzyklusdaten aus der Markierte-Mitosen-Kurve ist in Ref. (22) beschrieben.

Impulscytofluorometrie

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen und Zuordnung der verschiedenen bei der Zonal-Zentrifugation gewonnenen Fraktionen zu den entsprechenden Zellzyklusphasen wurden die gewaschenen Zellen in einer Mischung von Äthanol/H_2O (2:1, v/v) suspendiert. Die Analyse nach Färbung mit Mithramycin und Ethidiumbromid erfolgte wie bei Rajewski et al. (23) beschrieben.

2.2.7 Radioaktivitätsmessungen

Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität in ganzen Zellen

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 2 mal mit je 5 ml eiskalter Hanks-Lösung gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Zellniederschlag je nach Zellzahl mit 1

oder 2 ml 0,2 N NaOH lysiert, mit dem gleichen Volumen 10 % TCA versetzt und 30 min im Eisbad gehalten. Der Niederschlag wurde auf einem Glasfaserfilter gesammelt und bei 80°C getrocknet. Über Nacht wurde der Filter mit 0,5 ml Hyamine^{R} bei 37°C inkubiert. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte in 15 ml Toluolscintillator. Zählausbeuten und Kreuzkontamination bei $^{3}H/^{14}C$-Doppelmarkierung wurden durch Zugabe von ^{3}H- und ^{14}C-Toluolstandard ermittelt. Der Einbau wurde auf die Zellzahl umgerechnet.

2.2.8 Auswertung der Autoradiographien

2.2.8.1 Technik

Auf den entwickelten Objektträgern wurden unter dem Mikroskop bei einer Gesamtvergrößerung von 100- oder 400-fach geeignete Areale ausgewählt, in denen die DNA gut gespreitet war. Diese wurden mit einer Mikrophoto-Einrichtung photographiert, da die Auswertung mit einem Mikrometerokular nicht mit genügender Genauigkeit durchzuführen war. Die Aufnahmen wurden auf Agfa Copyline P 90 Papier vergrößert. Die Umrechnung der gemessenen Strecken erfolgte mit Hilfe einer Aufnahme der Neubauer-Zählkammer, deren Netz bei den entsprechenden Vergrößerungen photographiert wurde.

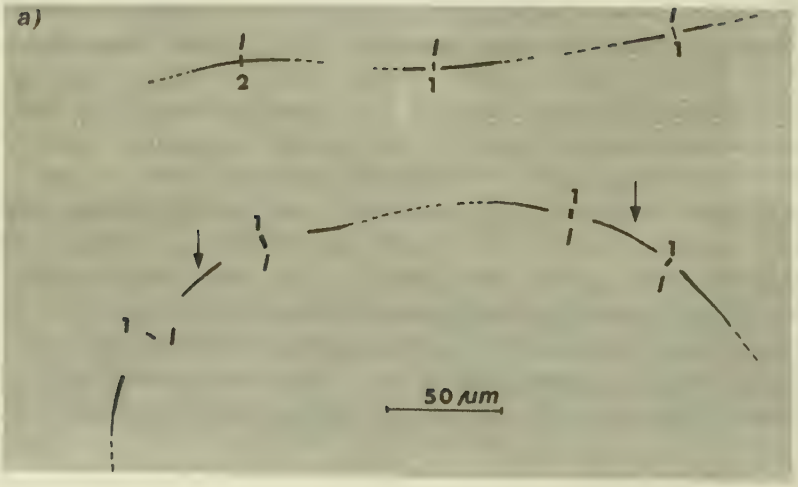
2.2.8.2 Auswertung

Mit Autoradiogramm wird im folgenden eine lineare Anordnung von markierten Strecken auf den Autoradiographien bezeichnet. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Markierungsschemata mit einem Wechsel der spezifischen Radioaktivität des ^{3}H-Thymidins kann man zwei Arten von Autoradiogrammen un-

terscheiden. Es gibt Replikationseinheiten, die mit der Replikation schon vor Beginn der Markierung begonnen haben. Zwischen den beiden markierten Strecken, die von den beiden divergierenden Gabeln gebildet werden, liegt ein unmarkiertes Stück DNA (s. Abb. 2a,b,c). Diese Anordnung wird mit "pre-pulse" Initiation bezeichnet. Daneben gibt es Replikationseinheiten, die mit der Replikation erst während des Pulses begonnen haben. Diese Anordnung wird mit "post-pulse" Initiation bezeichnet (s. Abb. 2a).
Die Richtung der Replikation kann man aus der Änderung der Silberkorndichte innerhalb der markierten Strecken erkennen, die durch den Wechsel der spezifischen Radioaktivität entsteht. Bei den "heiß-warm" Experimenten nimmt die Silberkorndichte innerhalb des Replikons nach außen hin ab, beim "warm-heiß" Markierungsschema nach außen hin zu (Abb. 2b). Bei dem Versuch, bei dem die Markierung in vivo durch zwei aufeinanderfolgende Injektionen vorgenommen wurde, erhält man in jeder Richtung zwei markierte Strecken mit abnehmender Silberkorndichte, die durch die Verdünnung der Radioaktivität in vivo entstehen (s. Abb. 2c).

Kriterien für die Zugehörigkeit zu einem DNA-Strang

Bei der Auswertung der Autoradiogramme ergibt sich eine Schwierigkeit dadurch, daß die markierten Strecken von nicht markierten unterbrochen sind und daher kein direkter Beweis für den Zusammenhang vorliegt. Huberman und Riggs (1) führten daher die Markierung durch zwei verschiedene spezifische Radioaktivitäten ein. Aus den Silberkorngradienten der entstehenden Autoradiogramme kann man so erkennen, ob sie dem Markierungsschema für einen Doppelstrang (oder zweier paralleler Doppelstränge, wenn diese noch nebeneinander liegen) entsprechen, oder ein Bündel von DNA-Fasern vorliegt. Auch in dieser Arbeit wurde die Zuordnung der Autoradiogramme anhand des Markierungsschemas durchgeführt.
Zwischen den Möglichkeiten, ob ein Paar von Tochterhelices noch zusammen vorliegt oder ob sie sich voneinander getrennt haben, kann man durch die Dichte der Silberkornmar-


a)
2
1
1
1
1
1
1
50 µm

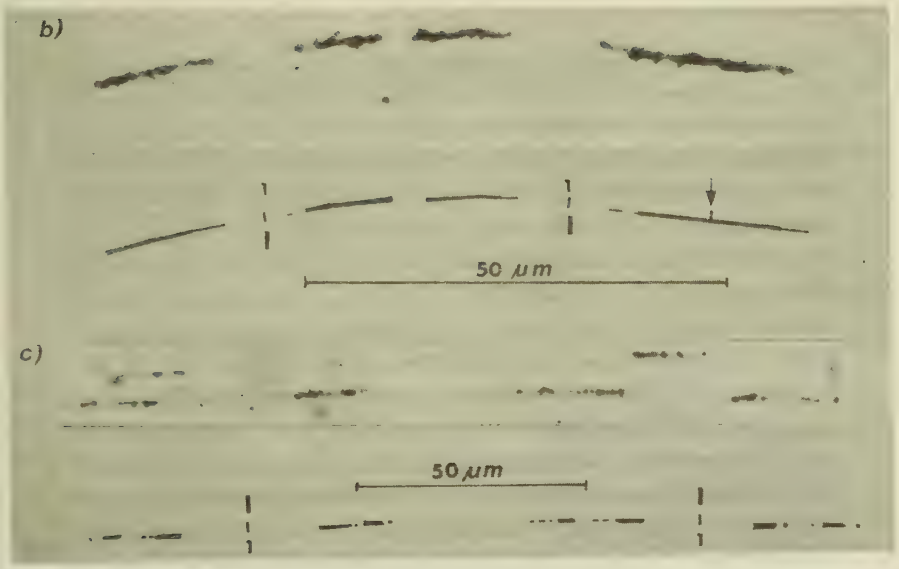


Abb. 2: Faserautoradiographien der DNA von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen mit Schemata; Maßstrecke jeweils 50 µm.

a) Markierungsschema "heiß/warm" bei asynchronen Zellen der 1. Passage mit 2 x 10^{-6} M 5-Fluordesoxyuridin:
30 min 1x10^{-6} M ^{3}H-Thymidin (46 Ci/mMol)
30 min 1,1x10^{-5} M ^{3}H-Thymidin (4,6 Ci/mMol)
1) pre-pulse Initiation
2) post-pulse Initiation
I Initiationspunkt
→ Verschmelzung zweier Replikationseinheiten während des heißen Pulses

b) Markierungsschema "warm/heiß" bei asynchronen Zellen der Dauerkultur (37. Passage):
20 min 1x10^{-7} M ^{3}H-Thymidin (46 Ci/mMol)
20 min 1x10^{-6} M ^{3}H-Thymidin (46 Ci/mMol)
1) pre-pulse Initiation
I Initiationspunkt
→ Verschmelzung zweier Replikationseinheiten während des heißen Pulses

c) Markierungsschema in vivo:
Zwei i.p. Injektionen von 500 µCi ^{3}H-Thymidin (100 Ci/mMol) im Abstand von 15 min. 10 min nach der 2. Injektion wurde der Einbau von ^{3}H-Thymidin nach Töten der Maus durch eiskalte Hanks-Lösung gestoppt.

1) pre-pulse Initiation
I Initiationspunkt

kierung unterscheiden. Huberman und Riggs (1) haben solche Dichtebestimmungen an DNA von CHO-Zellen durchgeführt und Werte für eine oder zwei markierte Polynucleotidketten angegeben. Diese Werte sind auf andere Zellarten übertragbar, wenn der intrazelluläre Pool von Thymidin und seiner Phosphate gleich Null ist, eine Voraussetzung, die bei den vorliegenden Versuchen nicht erfüllt ist. Vielmehr wurden zwei schon getrennte Tochterhelices am parallelen Markierungsmuster, der geringeren Markierungsdichte und der geringen räumlichen Entfernung identifiziert.
Da die Polarität der Markierung somit als einziges Kriterium für die Identifizierung einzelner Replikons diente, mußte sichergestellt werden, daß der Silberkorngradient der externen Verdünnung der Radioaktivität entspricht und nicht dadurch entsteht, daß sich der intrazelluläre Pool langsam mit Thymidin auffüllt und dadurch ein Gradient umgekehrter Polarität erzeugt wird. Die Zeit der Pulse muß daher lang sein gegen die Auffüllungszeit der intrazellulären Vorläufer-Pools. Bei den vorliegenden Versuchen betrug die kleinste Zeit für den "warmen" Puls 20 Minuten, die Auffüllungszeit des intrazellulären Pools der verwendeten Zellen beträgt dagegen 4 Minuten (24).

Bestimmung der Interinitiationsabstände (Replikongröße)

Es wurden nur interne Autoradiogramme ausgewertet, das sind solche, die an beiden Seiten noch Nachbarreplikons haben. Bei den Untersuchungen an in vivo markierten Zellen waren die Gruppen benachbarter Replikons kleiner, so daß auch solche Einheiten ausgewertet wurden, die nur Teile von Nachbarreplikons zeigten. Es wurden sowohl pre-pulse als auch post-pulse Autoradiogramme ausgewertet. Die Initiationspunkte wurden in die Mitte der Lücke bei pre-pulse initiierten und in die Mitte der stark bzw. schwach markierten Strecken (je nach Markierungsschema) bei post-pulse initiierten Replikationseinheiten gelegt.

Bestimmung der Replikationsgeschwindigkeiten

Es wurden nur interne Replikationseinheiten ausgewertet, die pre-pulse Initiationsmuster zeigten. Die Replikationsgeschwindigkeit wurde aus der Länge der stark markierten Strecken bzw. aus dem Abstand der beiden markierten Strekken bei in vivo Versuchen und der Markierungsdauer berechnet.

Statistische Bearbeitung der Daten

Die Berechnung der Mittelwerte erfolgte mit einem Tischrechner, Modell 46, Hewlett und Packard. Die statistischen Tests wurden nach Sachs (37) durchgeführt. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten und Regressionsgeraden erfolgte mit Hilfe eines in FORTRAN geschriebenen Programmes auf der TR 440 (Computer Gesellschaft, Konstanz) des Universitätsrechenzentrums Tübingen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methodik

3.1.1 Thymidin-Einbau in vitro, Einfluß von 5-Fluordesoxyuridin

Bei fast allen in der Literatur angegebenen faserautoradiographischen Untersuchungen wird vor und während des Versuches 5-Fluordesoxyuridin zur Hemmung der Thymidilat-Synthetase zugegeben (1,2,3,5,8,18,25,26,27,28,29,30,31). Von den in den vorliegenden Versuchen verwendeten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen ist bekannt, daß 5-Fluordesoxyuridin in dem Konzentrationsbereich, in dem die Thymidilat-Synthetase gehemmt wird, den Einbau von Thymidin in säureunlösliches Material hemmt (32). Da wegen der langen Expositionszeiten bei Faserautoradiographien eine Steigerung des Einbaus jedoch wünschenswert ist, wurde er in Gegenwart der von Huberman und Riggs (1) verwendeten Konzentration von 2×10^{-6} M 5-Fluordesoxyuridin überprüft.

5-Fluordesoxyuridin wurde 0,5 Std. vor Versuchsbeginn zugesetzt und die Markierung in Gegenwart von 5-Fluordesoxyuridin vorgenommen. Abb. 3 zeigt, daß der Einbau in säureunlösliches Material bis zu einer Inkubationsdauer von 20 Min. durch 5-Fluordesoxyuridin nicht wesentlich beeinflußt wird. Dann wird ein Plateau erreicht und nach 45 Min. ist eine Hemmung des Einbaus um 40 % festzustellen.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit dem Befund von Hand und Tamm (18), die fanden, daß 5-Fluordesoxyuridin in der wirksamen Hemmkonzentration für die Thymidilat-Synthetase bei L929-Mäuse-Fibroblasten nach 23 Min. die DNA-Kettenelongation hemmt, dagegen den Abstand der Initiationspunkte nicht beeinflußt. Dazu in Widerspruch stehen die Ergebnisse von Ockey und Saffhill (3), die bei 3T3-Mäuse-Fibroblasten sowohl eine Erniedrigung der Replikationsgeschwindigkeit

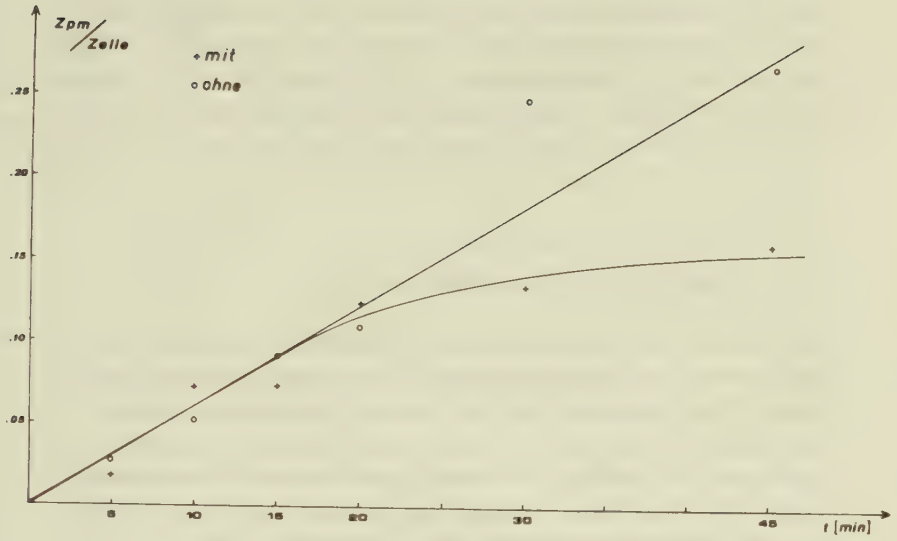


Abb. 3: Einfluß von 5-Fluordesoxyuridin auf den Einbau von ^{3}H-Thymidin in vitro:

0,5 Std. vor Markierung wurde dem Inkubationsmedium 2 x 10^{-6} M 5-Fluordesoxyuridin zugesetzt. Die Markierung erfolgte mit 1 x 10^{-6} M ^{3}H-Thymidin (42 Ci/mMol). 5, 10, 15, 20, 30 und 45 min nach Zugabe des ^{3}H-Thymidins wurde ein Zellaliquot entnommen und der Einbau in säureunlösliches Material bestimmt.
oo Kontrolle
++ mit 2 x 10^{-6} M 5-Fluordesoxyuridin.

als auch eine Verkleinerung des Abstandes der Initiationspunkte durch 4 x 10^{-7} M 5-Fluordesoxyuridin feststellten. Bei derselben Konzentration trat bei Mäuse-L-Zellen eine Anhäufung von kleinen, einsträngigen DNA-Molekülen (10 S) auf, die als Zwischenprodukt der DNA-Replikation interpretiert wurden (33). Bei der Wirkung von 5-Fluordesoxyuridin

auf den Einbau von Thymidin in die DNA scheint vor allem die Größe des intrazellulären Thymidin-Triphosphat-Pools eine ausschlaggebende Rolle zu spielen, durch den man die unterschiedlichen Versuchsergebnisse erklären kann (28,34). In den vorliegenden Versuchen setzt die verwendete Konzentration von 5-Fluordesoxyuridin den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA herab. Daher wurden die Versuche bis auf einen ohne Zusatz von 5-Fluordesoxyuridin durchgeführt.

3.1.2 Thymidin-Einbau-Kinetik in vivo

Bei den in vivo Versuchen sollte die Markierung der DNA durch zwei aufeinanderfolgende ^{3}H-Thymidin-Injektionen erfolgen. Um festzustellen, in welchem zeitlichen Abstand die beiden Injektionen gegeben werden müssen, um einen ausreichenden Wechsel der Markierungsdichte zu erreichen, wurde der zeitliche Verlauf des Einbaus von ^{3}H-Thymidin in vivo nach Vormarkierung mit ^{14}C-Thymidin untersucht. Abb. 4 zeigt den Einbau in säureunlösliches Material. Der Anstieg erfolgt in den ersten 4 Min. besonders steil. Dann ist die Hälfte des endgültigen Einbaus erreicht. Bis zu 16 Min. verlangsamt sich der Einbau zunehmend. Nach 16 Min. findet kein weiterer Einbau mehr statt. Zu diesem Zeitpunkt ist das zugeführte Thymidin durch körpereigenes herausverdünnt. Eine erneute Injektion von ^{3}H-Thymidin müßte dann gut zu erkennen sein. Bei den in vivo Versuchen wurde daher die zweite Injektion 15 Min. nach der ersten vorgenommen.

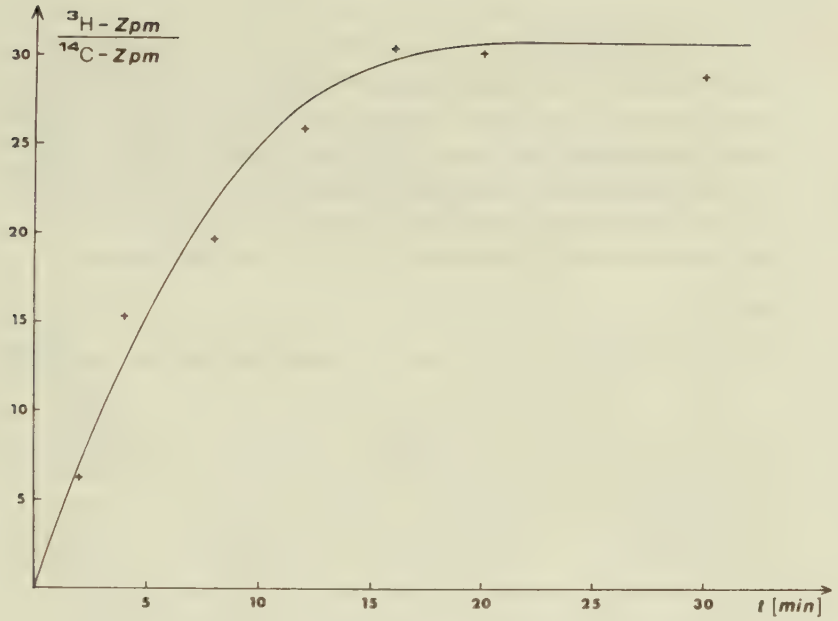


Abb. 4: Einbau von ^{3}H-Thymidin in säurefällbares Material in vivo. Vormarkierung durch zwei i.p. Injektionen von je 10 µCi ^{14}C-Thymidin 22 und 2 Std. vor i.p. Markierung mit ^{3}H-Thymidin (100 mCi/mMol; 46 Ci/mMol). Zu den angegebenen Zeiten nach der Markierung mit ^{3}H-Thymidin wurde ein Aliquot Aszites punktiert und der Einbau in säurefällbares Material gemessen.

3.1.3 Zellkinetische Daten

3.1.3.1 Dauerkultur

Tab. 1 faßt die zellkinetischen Daten der verwendeten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen zusammen. Die Daten für die Dauerkulturen werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Aufnahme einer Markierte-Mitosen-Kurve zwischen der 37. und 39. Passage ermittelt, aus der die Dauer der Zellzyklusphasen nach Okumura et al. (35) bestimmt wurde.

Tab. 1: Zellkinetische Daten von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen

Zellzyklus-parameter	in vivo (14)	1.Passage (14)	2.Passage (14)	Dauerkultur
Zellzyklus-zeit t_c Std	-	22,0	14,7	15,6
Zellverdopp-lungszeit t_d Std	34 ± 7	21,1±2,8	14,1±1,6	16,5
t_{G1} Std	-	8,3±4,0	4,7±1,9	5,1±2,6
t_S Std	17,8±4,1	11,0±4,1	7,5±1,9	9,3±1,7
t_{G2} Std	8,4±4,1	3,4±1,0	2,6±1,0	1,2±0,5

Man sieht, daß die Zellzyklusdaten der Dauerkultur in etwa denen von Zellen in der 2. in vitro Passage entsprechen.

Die bei diesen Untersuchungen im Verhältnis zu den übrigen Zellzykluszeiten verlängerte S-Phase kann man darauf zurückführen, daß für die Autoradiographien die empfindlichere Nuclear-Emulsion verwendet wurde und nicht der bei Probst und Maisenbacher (14) angegebene Stripping-Film (22,36).

3.1.3.2 Synchrone in vitro Kulturen

Ehrlich-Aszites-Tumorzellen von vier Mäusen wurden am 4. Tag nach der Inokulation durch Zonal-Zentrifugation unter sterilen Bedingungen synchronisiert (14) und Fraktion 36 zur Anlage einer synchronen Kultur mit 3 x 10^5 Zellen/ml eingesät. Die DNA-Synthese und die Zellzahl wurden alle 3 Std. überprüft, der Mitoseindex bei Anstieg jede Stunde. Die gewonnenen Daten sind in Abb. 5 zusammengefaßt.

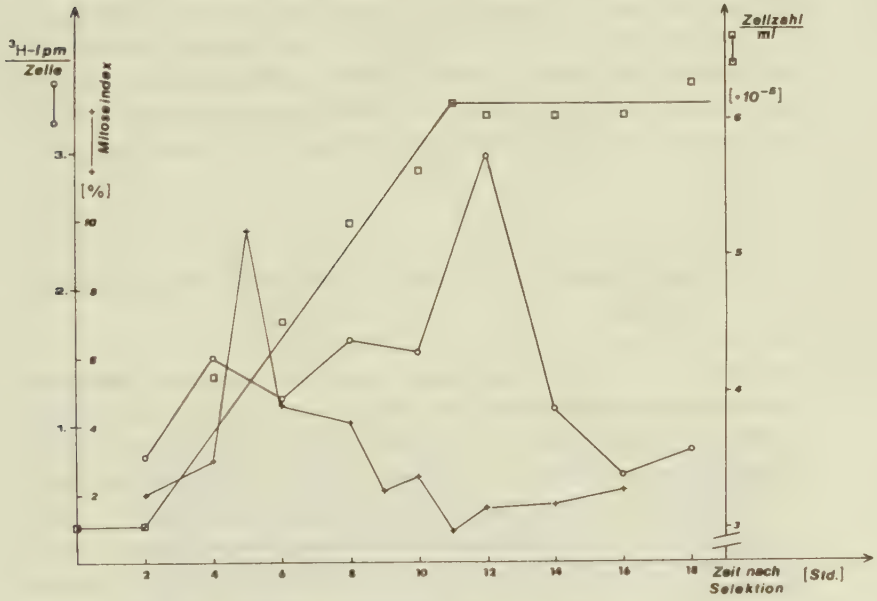


Abb. 5: Zellkinetische Daten einer in vitro Kultur synchroner Zellen, Selektion nach (14). Von Fraktion 36 wurde nach (16) eine in vitro Kultur angelegt. Messung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus: Markierungsschema "warm/heiß" (1 x 10^{-7} M / 1 x 10^{-6} M ^{3}H-Thymidin; 20 min/20 min).
o——o ^{3}H-Ipm/Zelle
+——+ Mitoseindex [%]
□——□ Zellzahl/ml

Die Zellzahl hat sich 8 Std. nach der Synchronisation verdoppelt, der Mitose-Peak nach 5 Std. fällt mit einem vorübergehenden Abfall des Thymidin-Einbaus zusammen. Die darauf folgende S-Phase nimmt etwa 8 Std. in Anspruch. Die Interinitiationsabstände und Replikationsgeschwindigkeiten wurden 8, 10 und 12 Std. nach der Synchronisation bestimmt. Die Zellen befinden sich dann in der frühen, der mittleren und der späten S-Phase.
Die so gewonnenen Kulturen sind nur unzureichend synchron, da sich die Zellverdopplung über einen Zeitraum von etwa 8 Std. hinzieht, die Zellzyklusdauer für synchronisierte Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in vitro jedoch nur 15 Std. und die S-Phase nur 8 Std. beträgt (14). Der Anteil von Zellen aus anderen Zellzyklusphasen könnte im schlechtesten Fall bis zu 50 % betragen. Auch mit einer Verunreinigung mit Zellen aus anderen Abschnitten der S-Phase ist zu rechnen.

3.1.3.3 Markierung in vivo und Auftrennung nach S-Phase Stadien

Bei dem hier angewandten Versuchsaufbau wurde auf jegliche Synchronisationsmaßnahmen vor der Markierung der DNA verzichtet. Diese wurde in vivo durch zwei aufeinanderfolgende Injektionen von ^{3}H-Thymidin hoher spezifischer Aktivität (100 Ci/mMol) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zonal-Zentrifugation aufgetrennt. Durch die Markierung vor der Selektion können die Nachteile des Verlusts an Synchronität in der Kultur vermieden werden. Da sich die Zellzykluszeiten in der Kultur aber beträchtlich von denen in vivo am 4. Tag nach der Inokulation unterscheiden (14), sind aus beiden Versuchsanordnungen gewonnene Daten nicht direkt vergleichbar.

Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der Auftrennung durch Zonal-Zentrifugation bei einem repräsentativen Versuch. Der Thymidin-Einbau erreicht ein erstes Maximum etwa 10 Fraktionen nach

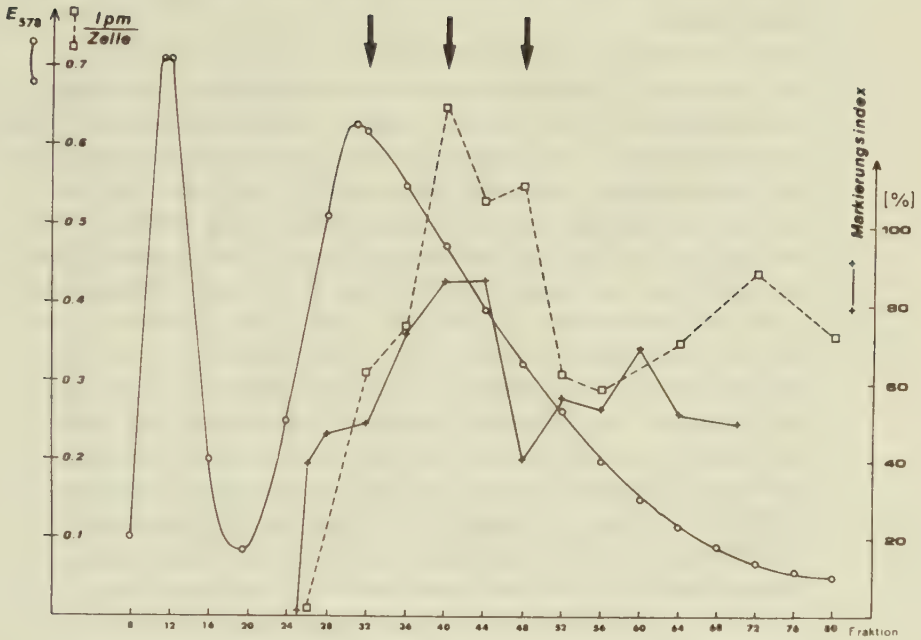


Abb. 6: Selektion synchroner, in vivo markierter Zellen. Markierung in vivo durch zwei i.p. Injektionen von je 500 µCi ^{3}H-Thymidin (100 Ci/mMol) im Abstand von 15 min; nach der Selektion nach (14) wurde in den angegebenen Fraktionen der Einbau von ^{3}H-Thymidin in säurefällbares Material und der Markierungsindex bestimmt, sowie impulscytofluorometrische Messungen des DNA-Gehalts der Zellen durchgeführt (s. Abb. 7 b-e).
o——o E_{578}; +——+ Markierungsindex [%];
□- - -□ ^{3}H-Ipm/Zelle;
➡ Fraktionen, in denen Interinitiationsabstände und Replikationsgeschwindigkeit bestimmt wurden.

dem Absorptionsmaximum. Der Markierungsindex erreicht in Fraktion 44 mit 86 % den höchsten Wert. Die Zuordnung der Fraktionen zu den einzelnen Zellzyklusabschnitten erfolgte

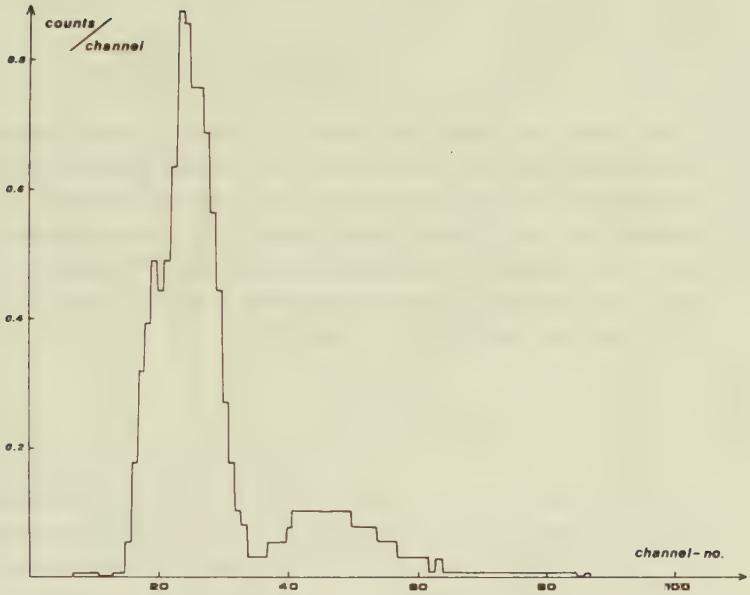
nach Probst und Maisenbacher (14) und anhand von impulszytofluorometrischen Bestimmungen des DNA-Gehalts der Zellfraktionen, die eine Überprüfung der zellkinetischen Daten ermöglichen.

Abb. 7a) zeigt das Histogramm des zellulären DNA-Gehalts von Fraktion 25 aus der Mitte des aufsteigenden Astes der Absorptionskurve bei 578 nm in Abb. 6. Nach zellkinetischen Untersuchungen (14) handelt es sich hier um reine G_1-Zellen. Das Hauptmaximum liegt bei Kanalzahl 24. In Abb. 7b) ist das Histogramm des zellulären DNA-Gehalts von Fraktion 34 vom Gipfel der Absorptionskurve in Abb. 6 dargestellt. Das Hauptmaximum ist gegenüber Fraktion 25 zu etwas höheren Kanalzahlen verschoben, die Zellen sind in die S-Phase eingetreten. Der DNA-Gehalt der Zellen von Fraktion 39 im oberen Drittel des absteigenden Astes der Absorptionskurve in Abb. 6 zeigt einen breiten Gipfel intermediären DNA-Gehaltes (Abb. 7c). Die Zellen befinden sich in der mittleren S-Phase. Im Histogramm des zellulären DNA-Gehaltes von Zellen der Fraktion 47 aus der Mitte des abfallenden Astes der Absorptionskurve ist eine weitere Verschiebung des Hauptgipfels zu größeren Kanalzahlen zu erkennen (Abb. 7d). Die Zellen befinden sich in der späten S-Phase. Die auf Fraktion 47 folgenden zeigen neben einem Anstieg des Gipfels mit G_2-Gehalt bei Kanalzahl 48 bis 50 einen Wiederanstieg des Gipfels mit G_1-DNA-Gehalt. Diese Fraktionen sind daher nicht als synchron zu betrachten und für weitere Untersuchungen nicht zu verwenden.

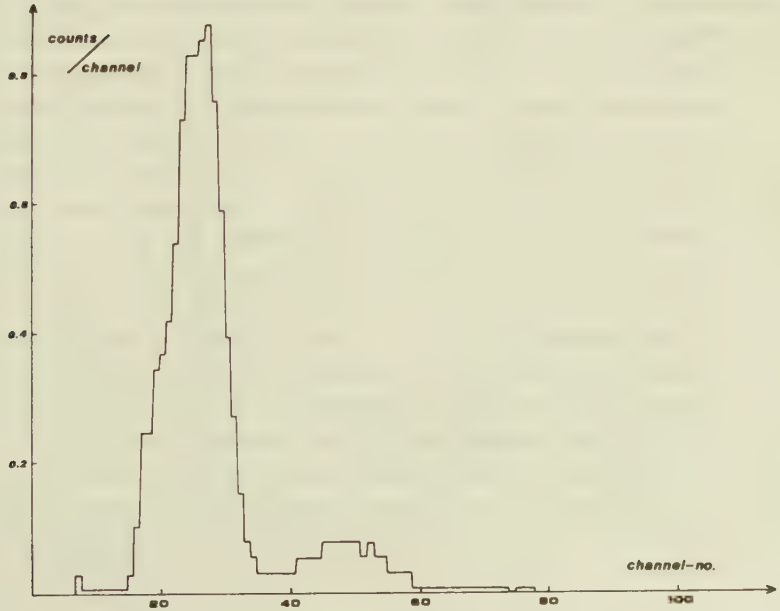
Die Interinitiationsabstände und Replikationsgeschwindigkeiten wurden bei Zellen der Fraktionen 32, 40 und 48 bestimmt, die sich in der frühen, der mittleren und der späten S-Phase befinden.

Abb. 7: Zellulärer DNA-Gehalt einzelner Zellfraktionen nach der Selektion (14). Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte nach (23).
a) Fraktion 25
b) Fraktion 34
c) Fraktion 39
d) Fraktion 47
Position der Fraktionen nach der Selektion s. Abb. 6, weitere Erläuterungen im Text.

a)


counts
channel
0.8
0.6
0.4
0.2
channel-no.
20
40
60
80
100

b)


counts
channel
0.8
0.6
0.4
0.2
channel-no.
20
40
60
80
100

c)

counts
channel
0.8
0.6
0.4
0.2
channel-no.
20
40
60
80
100
120

d)

counts
channel
0.8
0.6
0.4
0.2
channel-no.
20
40
60
80
100
120

3.2 Faserautoradiographische Befunde

3.2.1 Interinitiationsabstände

Eingangs wurde bereits erwähnt, daß einer der denkbaren Regulationsmechanismen der Intensität der DNA-Replikation darin bestehen könnte, daß die Häufigkeit der Initiation pro Längeneinheit variiert. Dieses müßte mit der Änderung der Abstände der Initiationspunkte einhergehen. Daher wurden die Interinitiationsabstände unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und im Verlauf der S-Phase bestimmt.

3.2.1.1 Fehlerquellen

Bei der Bestimmung der Interinitiationsabstände gibt es folgende Fehlermöglichkeiten (6):

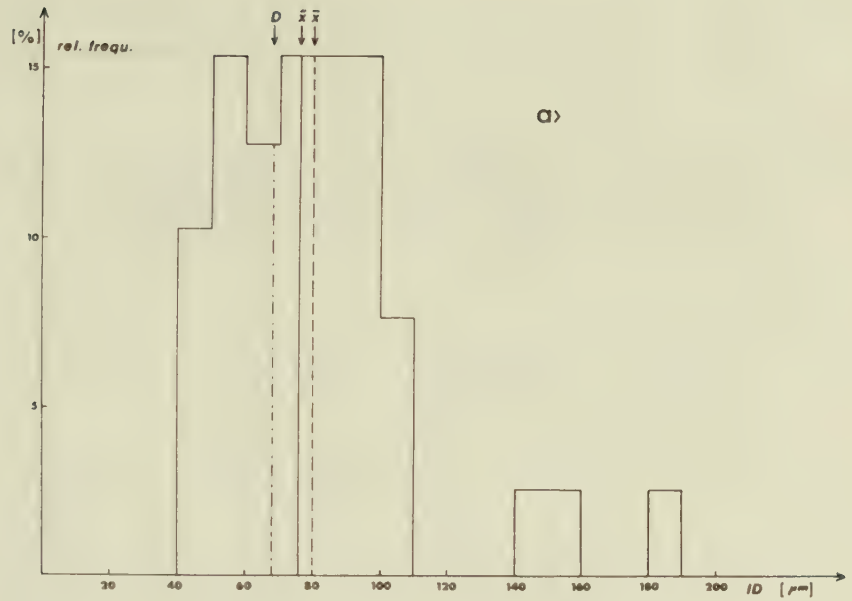
1. Man übersieht besonders kleine Replikationseinheiten, die noch während der Markierungszeit mit einer der beiden spezifischen Radioaktivitäten verschmelzen.
2. Die auf Autoradiographien unmarkierten Strecken können Einheiten enthalten, die erst nach Beendigung der Markierungszeit aktiviert werden.
3. Große Interinitiationsabstände werden nicht registriert, weil der Zusammenhang der einzelnen Einheiten nicht ersichtlich ist.
4. Bei großen Abständen ist die Bruchwahrscheinlichkeit erhöht, so daß der Zusammenhang zwischen großen benachbarten Einheiten verloren geht.

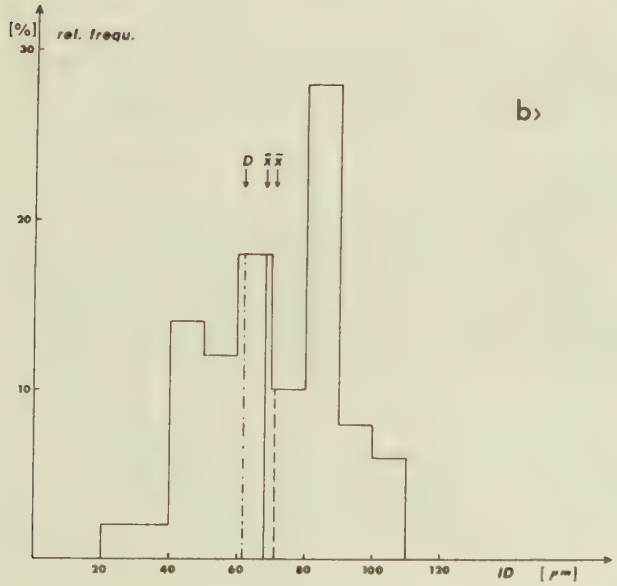
Punkt 1 und 2 führen zu einer Überschätzung der Interinitiationsabstände, Punkt 3 und 4 zu einer Unterschätzung, so daß sie sich teilweise kompensieren können. Bei diesen Untersuchungen sollten hauptsächlich Werte unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und Zellzyklusstadien verglichen werden, weniger die absoluten Größen ermittelt werden. Da bei allen Versuchen die Auswertungsmethode dieselbe war,

dürften die oben aufgeführten Fehlerquellen keinen großen Einfluß auf die Aussagekraft der Ergebnisse haben.

3.2.1.2 Interinitiationsabstände asynchroner Kulturen

Abb. 8 zeigt die Histogramme der Interinitiationsabstände von asynchronen Zellen in der ersten in vitro Passage mit und ohne Fluordesoxyuridin und solchen in der 37. Passage der Dauerkultur.
Die kleinsten gefundenen Werte betragen 20 bis 30 µm, die größten über 200 µm. Eine Prüfung der Verteilungen der Interinitiationsabstände auf ihre Symmetrie (37) ergibt, daß nur diejenige von asynchronen Zellen in der 1. Passage ohne Fluordesoxyuridin als angenähert symmetrisch betrachtet werden kann, die übrigen müssen als schiefe Verteilungen behandelt werden. Prüft man im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz, ob die Interinitiationsabstände einer logarithmischen Normalverteilung folgen, so ergibt sich, daß diese Verteilung in allen drei Fällen eine gute Näherung darstellt (37).
Aus Tab. 2 kann man die Kenngrößen dieser Verteilungen entnehmen. Für asynchrone Zellen, die ohne 5-Fluordesoxyuridin inkubiert wurden, sind auch diejenigen Werte angegeben, die man unter der Annahme einer Normalverteilung findet. Die Medianwerte, die diese Verteilungen besser charakterisieren als die Mittelwerte, liegen für asynchrone Kulturen zwischen 54 und 76 µm. Die Verteilungen der asynchronen Kulturen in der ersten Passage mit und ohne 5-Fluordesoxyuridin unterscheiden sich nicht signifikant. Beide unterscheiden sich jedoch auf demselben Signifikanzniveau von derjenigen der Interinitiationsabstände von Zellen in der Dauerkultur ($P = 0{,}05$, zweiseitiger Test nach Kolmogoroff und Smirnoff). Der angewendete Test erfaßt Unterschiede in der Verteilungsform, insbesondere Unterschiede in der zentralen Tendenz (Mittelwert, Median), der Streuung, der Schie-


[%]
rel. frequ.
D
x̄
x̃
a)
15
10
5
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
ID [µm]


[%]
rel. frequ.
30
20
10
D
x̄
x̃
b)
20
40
60
80
100
120
ID [µm]

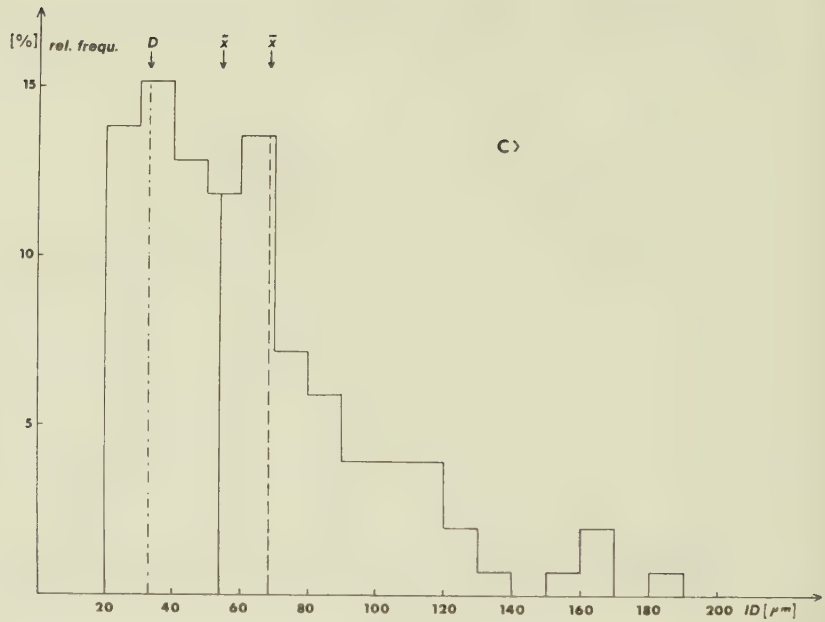


Abb. 8: Histogramme der Interinitiationsabstände (ID) asynchroner Kulturen:

a) 1. Passage ohne FdUrd, Markierungsschema "heiß/warm" (1 x 10^{-6} M / 1,1 x 10^{-5} M Thymidin, 30 min/30 min)

b) 1. Passage mit 2 x 10^{-6} M FdUrd, Markierungsschema "heiß/warm" (1 x 10^{-6} M / 1,1 x 10^{-5} M Thymidin, 30 min/30 min)

c) 37. Passage, Markierungsschema "warm/heiß" (1 x 10^{-7} M / 1 x 10^{-6} M Thymidin, 46 Ci mMol, 20 min/20 min)

——— Median $\tilde{x}$, ----- Mittelwert $\bar{x}$, -·- Dichtemittel D (Modus) unter Voraussetzung einer logarithmischen Normalverteilung.

fe und des Exzess, ist also auch bei schiefen Verteilungen sehr empfindlich (37).

Tab. 2: Kenngrößen der Verteilungen der Interinitiationsabstände unter Voraussetzung einer logarithmischen Normalverteilung. Die Werte in Klammern bei asynchronen Kulturen in der 1. Passage ohne 5-Fluordesoxyuridin gelten unter Voraussetzung einer Normalverteilung.

Kenngröße	Asynchron 1. Passage ohne FdUrd (n = 39)	Asynchron 1. Passage mit FdUrd (n = 50)	Asynchron 37. Passage (n = 152)
Mittelwert [µm]	80,2 (81,0±30,4)	70,9	68,1
Median [µm]	76,7 (80,0)	68,0	53,6
Modus [µm]	67,9 (80,0)	61,5	33,3
Streufaktor	1,40	1,36	1,99
90 %-Vertrauensbereich µm	66,0-105,9	59,3-92,1	27,0-106,7

Die bei Zellen in der Dauerkultur im Vergleich zu der ersten Passage nach der Explantation verkürzte S-Phase könnte demnach zumindest teilweise durch eine höhere Initiationsdichte zustande kommen. Die Interinitiationsabstände bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen ändern sich hingegen unter der Wirkung von 2×10^{-6} M 5-Fluordesoxyuridin nicht. 5-Fluordesoxyuridin wirkt demnach wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus auf die DNA-Replikation und nicht über eine Änderung der Replikongröße, wie sie bei 3T3-Mäusefibroblasten gefunden wurde (3).

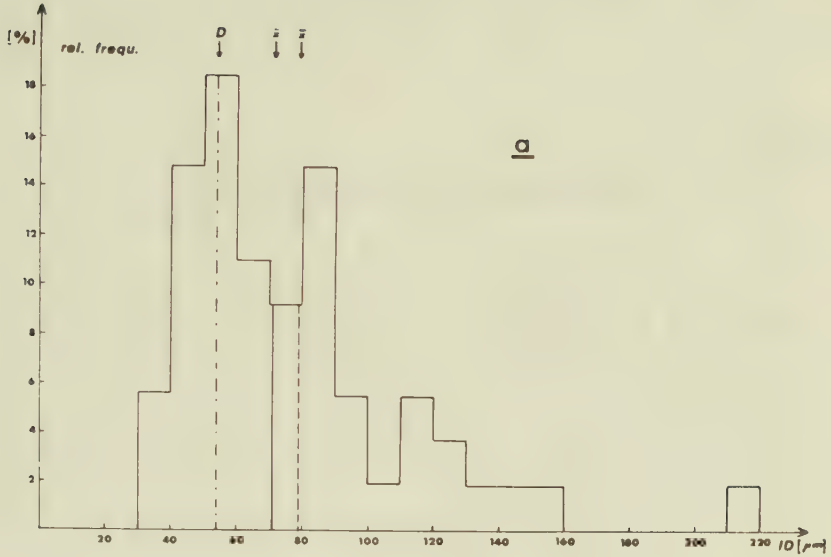
3.2.1.3 Interinitiationsabstände im Verlauf der S-Phase bei synchronen Kulturen

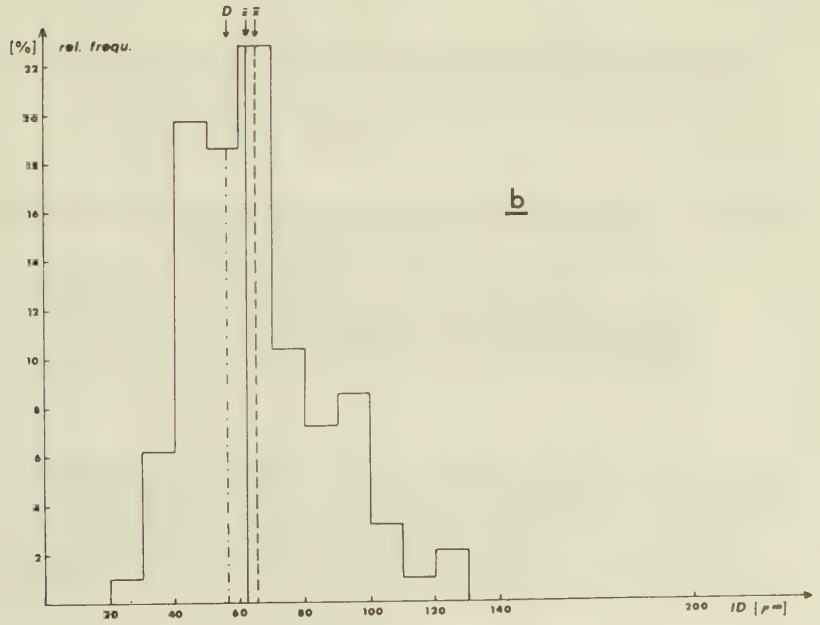
Abb. 9 zeigt die Interinitiationsabstände zu verschiedenen Zeiten der S-Phase bei Zellen, die zuerst selektioniert und dann in vitro markiert wurden. Die kleinsten gefundenen Werte sind auch hier wieder 20 bis 30 µm, die größten über 200 µm. Die Verteilungen sind in guter Näherung als logarithmische Normalverteilungen zu betrachten, wie die Prüfung im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz ergab. Sie unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Ihre Kenngrößen sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Kenngrößen der Verteilungen der Interinitiationsabstände bei einer synchronen, in vitro markierten Kultur im Verlauf der S-Phase unter Voraussetzung einer logarithmischen Normalverteilung.

Kenngröße	Frühe S-Phase (n = 54)	Mittlere S-Phase (n = 97)	Späte S-Phase (n = 95)
Mittelwert [µm]	76,8	65,0	66,2
Median [µm]	70,8	61,7	60,7
Modus [µm]	54	55,8	51,1
Streufaktor	1,50	1,38	1,52
90 %-Vertrauensbereich	47,3-106,0	44,9-84,9	23,6-115,3

Vergleicht man die Verteilungen für asynchrone Zellen in der ersten Passage ohne 5-Fluordesoxyuridin mit der Gesamtverteilung der Replikongrößen der synchronen, in vitro mar-


[%]
rel. frequ.
D
a
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
ID [µm]


[%]
rel. frequ.
D
b
20
40
60
80
100
120
140
200
ID [µm]

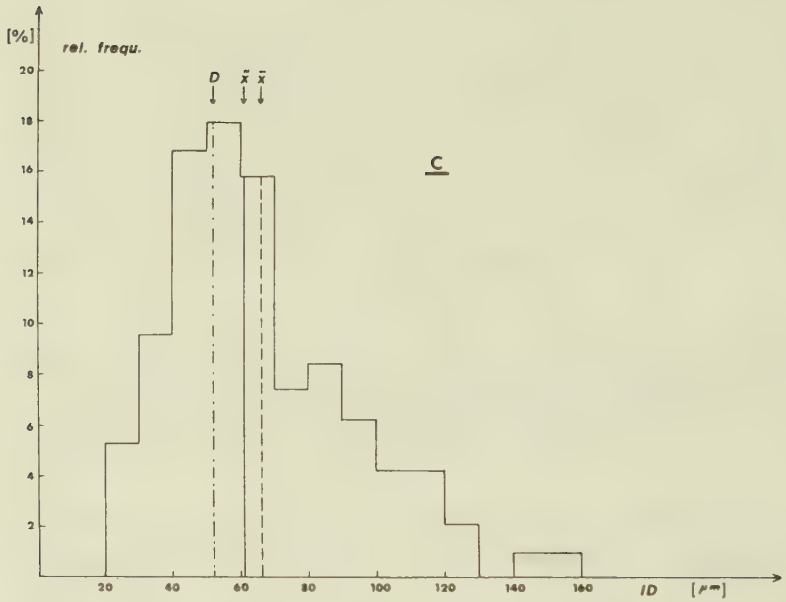


Abb. 9: Histogramme der Interinitiationsabstände (ID) in verschiedenen S-Phase-Stadien in vitro:
a) frühe, b) mittlere, c) späte S-Phase
——— Median $\tilde{x}$, ----- Mittelwert $\bar{x}$, -·- Dichtemittel D (Modus) unter Voraussetzung einer logarithmischen Normalverteilung.
Markierungsschema: "warm/heiß", 20 min/20 min
(1 x 10^{-7} M / 1 x 10^{-6} M ^{3}H-Thymidin, 46 Ci/mMol).

kierten Zellen, so findet man keinen statistisch signifikanten Unterschied. Der Unterschied zu derjenigen von Zellen in der Dauerkultur ist jedoch statistisch signifikant (P = 0,05, zweiseitiger Test nach Kolmogoroff und Smirnoff).

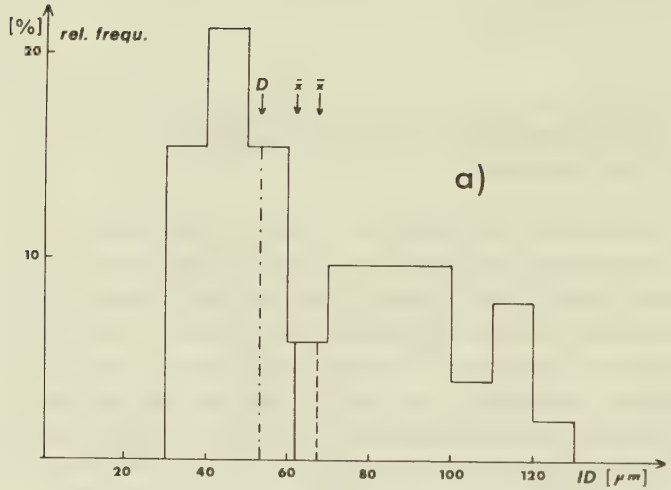
Die Zellen in der synchronen Kultur sind in dieser Hinsicht eher ähnlich asynchronen Zellen der ersten in vitro Passage.

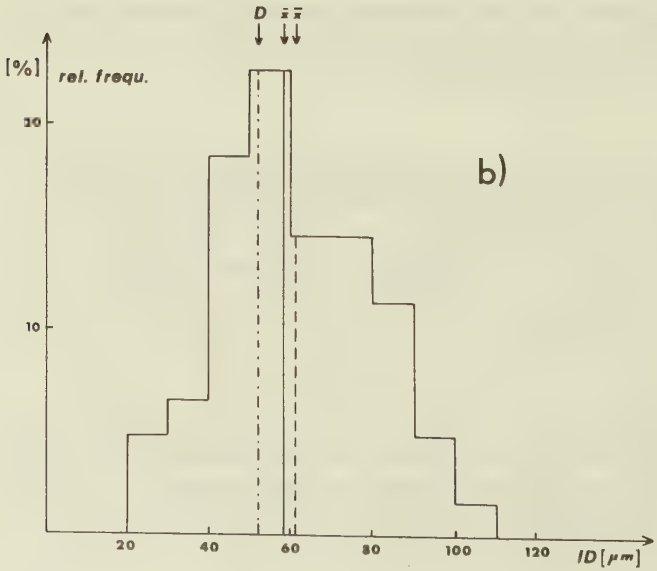
3.2.1.4 Interinitiationsabstände im Verlauf der S-Phase in vivo

In Abb. 10 sind die Histogramme der Interinitiationsabstände von Zellen dargestellt, die zuerst in vivo markiert und dann durch Zonal-Zentrifugation aufgetrennt wurden. Die Replikongrößen liegen im Bereich von 20 bis 130 µm. Es fehlen die großen Einheiten, die bei allen anderen Wachstumsbedingungen auftreten. Die Prüfung auf den Verteilungstyp im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz zeigt, daß die Interinitiationsabstände wieder einer logarithmischen Normalverteilung folgen. Ihre Kenngrößen sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4: Kenngrößen der Verteilungen der Interinitiationsabstände bei in vivo markierten Zellen in verschiedenen S-Phase-Stadien unter Voraussetzung einer logarithmischen Normalverteilung.

Kenngröße	Frühe S-Phase (n = 52)	Mittlere S-Phase (n = 62)	Späte S-Phase (n = 58)
Mittelwerte [µm]	67,1	61,4	62,9
Median [µm]	62,0	57,8	58,6
Modus [µm]	52,9	51,7	50,8
Streufaktor	1,49	1,40	1,46
90 %-Vertrauensbereich	41,6-92,0	41,4-80,6	40,1-85,5


[%]
rel. frequ.
20
10
D
x̄
x̄
a)
20
40
60
80
100
120
ID [µm]


D
x̄ x̄
[%]
rel. frequ.
20
10
b)
20
40
60
80
100
120
ID [µm]

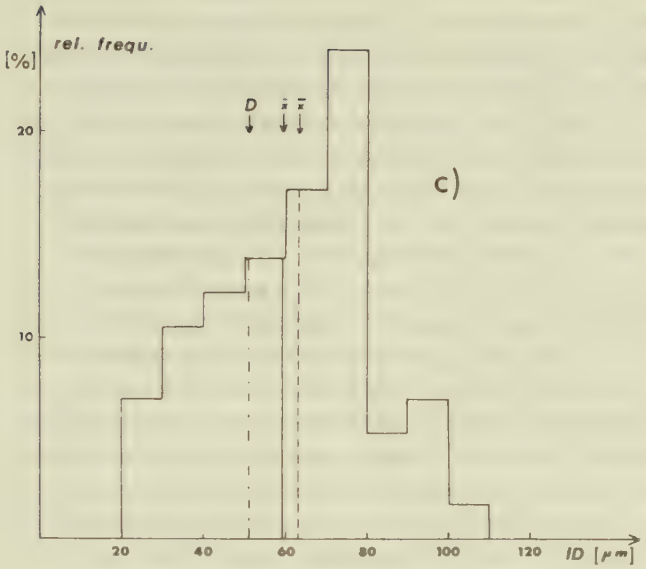


Abb. 10: Histogramme der Interinitiationsabstände (ID) in verschiedenen Abschnitten der S-Phase in vivo: a) frühe, b) mittlere, c) späte S-Phase; ——— Median $\tilde{x}$, ----- Mittelwert $\bar{x}$, -·- Dichtemittel D unter Voraussetzung einer logarithmischen Normalverteilung. Markierung in vivo durch zwei i.p. Injektionen von 500 µCi ^{3}H-dThd (100 Ci/mMol) im Abstand von 15 min.

Wie bei den unbefriedigend synchronen, in vitro markierten Zellen zeigen sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verteilungen im Verlauf der S-Phase. Vergleicht man die Gesamtverteilung mit derjenigen von synchronen, in vitro markierten Zellen, derjenigen von asynchronen Zellen in der 1. Passage und von Zellen in der Dauerkultur, so findet man nur einen signifikanten Unterschied zu Zellen in der 1. Passage ohne Fluordesoxyuridin

(P = 0,05, zweiseitiger Test nach Kolmogoroff und Smirnoff).

Die vorliegenden Untersuchungen stimmen mit denen von Housman und Huberman (7) überein, die feststellten, daß im Verlauf der S-Phase nach Aufheben eines Colcemid-Block keine Änderungen in der Größe der Replikationseinheiten bei CHO-Zellen auftreten. Painter und Schaefer (4) schlossen aus einem Anstieg der spezifischen Aktivität pro Zelle bis zur Mitte bei synchronen HeLa S3 Zellen, daß mehr Replikationseinheiten aktiviert werden. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ein solcher Anstieg der spezifischen Aktivität von der frühen bis zur mittleren S-Phase gefunden (s. Abb. 5). Es gibt drei mögliche Gründe für diesen Befund. Erstens könnten vermehrt Replikationseinheiten aktiviert werden, wodurch sich der Abstand der Interinitiationspunkte ändert. Diese Möglichkeit konnte durch die vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden. Zweitens könnte eine Aktivierung einer Gruppe von Replikationseinheiten durchschnittlicher Größe (Cluster) ebenfalls zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität pro Zelle führen. Drittens würde auch eine Erhöhung der Replikationsgeschwindigkeit zu einem erhöhten Thymidin-Einbau pro Zelle führen. Diese beiden Möglichkeiten werden in den folgenden Kapiteln untersucht.

3.2.1.5 Variationen der Interinitiationsabstände innerhalb einer Gruppe benachbarter Replikationseinheiten

In der Literatur wird eine benachbarte Gruppe von Replikationseinheiten, die zu etwa demselben Zeitpunkt aktiviert werden, als Cluster bezeichnet. Die Einheiten sind im Mittel so weit voneinander entfernt, daß die Zeit bis zur Verschmelzung der durch sie gebildeten Blasen oder Schleifen zu einer Riesenschleife klein ist im Vergleich zur Dauer

der S-Phase (10). Es wird angenommen, daß diese Cluster Regulationseinheiten darstellen (5), innerhalb derer die Gabelgeschwindigkeiten und die Replikongrößen ähnlich sind. Um diese Hypothese in Bezug auf die Replikongröße zu überprüfen, wurden die Interinitiationsabstände benachbarter Einheiten gegeneinander aufgetragen und die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient für die entsprechenden Punktwolken berechnet. Als Beispiel sind die Ergebnisse für die synchronen, in vivo markierten Zellen in Abb. 11 dargestellt.

Da die vorhergehenden Ergebnisse darauf hinweisen, daß die Verteilung der Interinitiationsabstände log-normal sind, wurden die oben genannten Größen auch für die Logarithmen der Replikongrößen berechnet. Die Regressionsrechnungen sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Da sich die Verteilungen der Interinitiationsabstände bei synchronen Zellen im Verlauf der S-Phase nicht unterscheiden, wurden die Berechnungen für die Gesamtverteilungen durchgeführt.

Aus Tab. 5 kann man entnehmen, daß die Korrelationskoeffizienten für die Logarithmen der Replikongrößen zwischen 0,43 für synchrone, in vitro markierte Zellen und 0,70 für die asynchronen Zellen in der Dauerkultur variieren.

Die Korrelationskoeffizienten für die Logarithmen der Replikongrößen sind zum Teil kleiner als diejenigen für die Größen selbst. Das kann man darauf zurückführen, daß bei der Berechnung der Regressionsgerade aus den Logarithmen die kleineren Werte stärker ins Gewicht fallen, die aus meßtechnischen Gründen die größten Fehler aufweisen. Alle Korrelationskoeffizienten sind statistisch signifikant (s. Tab. 5). Trotzdem sind die Variationen innerhalb der einzelnen Cluster beträchtlich; 4 % aller Paare unterscheiden sich in der Länge sogar um 100 % und mehr.

Auch bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen lassen sich die von Hand (5) und McFarlane und Callan (6) gefundenen Cluster von mehreren Replikationseinheiten gleicher Größe nachweisen. Ob sie auch als regulative Einheiten betrachtet werden können, wird in einem späteren Kapitel noch diskutiert.

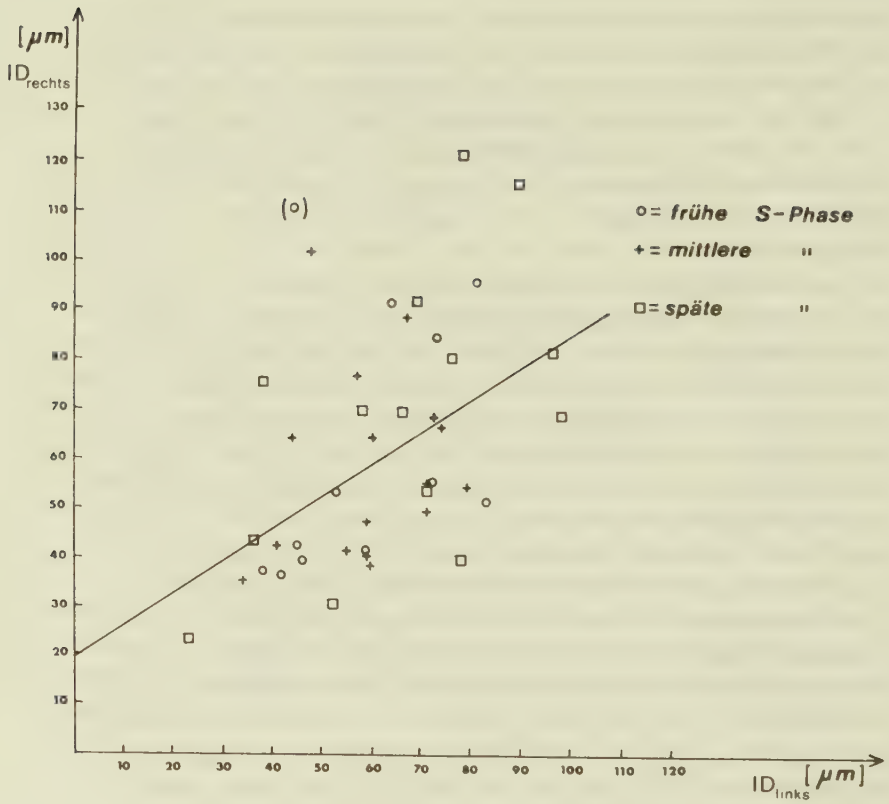


Abb. 11: Korrelation der Interinitiationsabstände innerhalb einer Gruppe benachbarter Replikationseinheiten bei synchronen,in vivo markierten Zellen. Markierung in vivo durch zwei i.p. Injektionen von je 500 µCi ^{3}H-Thymidin (100 Ci/mMol). Zwei benachbarte Interinitiationsabstände µm sind gegeneinander aufgetragen. o Paare aus der frühen, + Paare aus der mittleren, □ Paare aus der späten S-Phase; r = 0,48.

Tab. 5: Beziehung zwischen den Größen benachbarter Replikationseinheiten
r Korrelationskoeffizient
a Steigung der Regressionsgeraden
b Achsenabschnitt
Der Index L gibt an, daß die Werte unter Voraussetzung einer logarithmischen Normalverteilung der Interinitiationsabstände berechnet wurden, fehlender Index unter Voraussetzung einer Normalverteilung.

Art der Population	r_L	a_L	b_L	r	a	b
Asynchron 1. Passage mit und ohne FdUrd (n = 22)	0,54 (P=0,01)	0,46	1,00	0,69 (P=0,001)	0,57	32,7
Asynchron 37. Passage 4 + 8 Std. (n = 68)	0,70 (P=0,001)	0,71	0,55	0,75 (P=0,001)	0,87	14,4
Synchrone Kulturen (n = 103)	0,43 (P=0,001)	0,42	1,05	0,44 (P=0,001)	0,44	38,6
Synchron in vivo (n = 42)	0,55 (P=0,001)	0,68	0,53	0,48 (P=0,01)	0,65	19,5

3.2.2 Replikationsgeschwindigkeit

Der Ausdruck "Replikationsgeschwindigkeit" wird in den folgenden Kapiteln synonym mit "Fortbewegungsgeschwindigkeit einer Replikationsgabel" und "Wachstumsgeschwindigkeit" verwendet. Sie gibt die unidirektionale Replikationsgeschwindigkeit (µm/min x Gabel) an. Die bidirektionale Replikationsgeschwindigkeit ist gleich dem Doppelten der angegebenen Werte.
Durch die folgenden Untersuchungen sollte nachgeprüft werden, ob sich die Replikationsgeschwindigkeit unter den verschiedenen Kulturbedingungen und im Verlauf der S-Phase ändert und so als regulatorische Größe der DNA-Replikation anzusehen ist.

3.2.2.1 Replikationsgeschwindigkeit bei asynchronen Zellen

Tab. 6 gibt eine Zusammenfassung der Replikationsgeschwindigkeiten für asynchrone Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen.
Als Replikationsgeschwindigkeit asynchroner Zellen wurde je nach Vorbehandlung 0,50 bis 0,79 µm/min x Gabel gemessen. Der Unterschied von 0,21 µm/min x Gabel zwischen den Geschwindigkeiten bei der asynchronen Kultur mit FUdrd bei einem 10-Minuten- und einem 30-Minuten-Puls ist signifikant ($P = 0,05$, Student's t-Test), ebenso derjenige von 0,13 µm/min x Gabel von Zellen in der Dauerkultur 4 Std. und 8 Std. nach der Einsaat ($P = 0,05$, Student's t-Test). Den ersten Befund kann man damit erklären, daß es eine gewisse Zeit dauert, ehe die Hemmwirkung von 5-Fluordesoxyuridin eintritt, wie Hand und Tamm (18) an Mäusefibroblasten nachgewiesen haben. Schwieriger zu deuten sind die Ergebnisse in der Dauerkultur. In der 1. Passage beträgt die Anlaufzeit von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen etwa 2 Stunden. Bei den vorliegenden Untersuchungen in der Dauerkultur

trat eine meßbare Zellvermehrung erst nach 3 bis 4 Stunden auf, so daß man annehmen kann, daß die Adaptation an das neue Medium länger dauerte.

Tab. 6: Replikationsgeschwindigkeit (R) asynchroner Zellen und Standardabweichungen (SD)

	R [µm/min x Gabel]	SD [µm/min x Gabel]
Asynchron, 1.Passage ohne FdUrd (n=30)	0,59	0,16
Asynchron, 1.Passage mit FdUrd		
10 min "heiß" (n=108)	0,79	0,27
30 min "heiß" (n=36)	0,50	0,13
Asynchron, 37.Passage, 4 Std. nach Einsaat (n=36)	0,59	0,31
8 Std. nach Einsaat (n=142)	0,72	0,30

Vergleicht man die Replikationsgeschwindigkeit der Zellen in der Dauerkultur 8 Std. nach der Einsaat mit derjenigen in der 1. Passage, so unterscheidet sie sich nur von derjenigen von Zellen ohne FdUrd signifikant ($P = 0,05$). Man könnte daraus ableiten, daß bedingt durch die kürzere S-Phase von Zellen in der Dauerkultur die Replikationsgeschwindigkeit zunimmt. Ob diese Interpretation allgemein zutrifft, wird später noch für andere Wachstumsbedingungen diskutiert.

3.2.2.2 Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase bei synchronen Kulturen

Tab. 7 zeigt den Verlauf der Replikationsgeschwindigkeit während der S-Phase bei einer synchronen Kultur.

Tab. 7: Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase bei synchronen, in vitro markierten Zellen

Abschnitt der S-Phase	R [µm/min x Gabel]	SD [µm/min x Gabel]
Frühe S-Phase (n = 90)	0,75	0,23
Mittlere S-Phase (n = 104)	0,80	0,22
Späte S-Phase (n = 82)	0,91	0,44

Die Wachstumsgeschwindigkeiten nehmen im Verlauf der S-Phase von 0,75 auf 0,91 µm/min x Gabel zu. Die Unterschiede der Werte der frühen und mittleren S-Phase zu demjenigen in der späten S-Phase sind signifikant ($P = 0,01$, $P = 0,05$, Student's t-Test). Bei diesen Untersuchungen ist zu berücksichtigen, daß die Zeiten für den warmen und den heißen Puls bei dem hier verwendeten Markierungsschema "warm/heiß" jeweils 20 Min. betrug. Der mittlere Interinitiationsabstand für diese Kulturen beträgt aber 65 bis 70 µm, so daß damit zu rechnen ist, daß bei einer mittleren Replikationsgeschwindigkeit von 0,85 µm/min x Gabel ein großer Teil der Einheiten die Replikation bereits abgeschlossen hatte, ehe der heiße Puls beendet war. Das kann man auch daraus ersehen, daß die Zahl der Replikationseinheiten, die für die Berechnung der Interinitiationsabstände ausgewertet wurde (verschmolzene und nicht verschmolzene Replikons),

viel größer war als diejenige, aus denen die Replikationsgeschwindigkeit berechnet wurde (nicht verschmolzene Replikons). Diese Differenz ist aber auch zum Teil dadurch bedingt, daß für die Bestimmung der Interinitiationsabstände post-pulse-Autoradiogramme mit ausgewertet wurden. Das bedeutet aber, daß bei der Berechnung der Replikationsgeschwindigkeiten entweder nur die größten Einheiten oder solche mit kleiner Replikationsgeschwindigkeit erfaßt wurden und die in Tab. 6 angegebenen Werte zu klein sind. Zudem ist zu beachten, daß es sich bei den Kulturen nicht um streng synchrone Populationen handelt, daß die Werte also nur Näherungswerte darstellen.
Vergleicht man die Replikationsgeschwindigkeiten in den einzelnen Abschnitten der S-Phase mit denen der asynchronen Zellen in der 1. Passage ohne 5-Fluordesoxyuridin, so erweisen sich die Unterschiede alle als statistisch signifikant ($P = 0{,}001$, Student's t-Test). Im Vergleich mit der Dauerkultur in der 37. Passage 8 Std. nach der Einsaat ist nur die Wachstumsgeschwindigkeit in der späten S-Phase signifikant erhöht ($P = 0{,}01$).

3.2.2.3 Replikationsgeschwindigkeiten im Verlauf der S-Phase in vivo

Für diese Messungen wurde die DNA nur einer Maus in vivo markiert (s. Methoden) und nach Zellzyklusphasen aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefaßt.
Die Werte für die Wachstumsgeschwindigkeiten in den verschiedenen Abschnitten von 1,13 und 1,20 µm/min x Gabel unterscheiden sich nicht statistisch signifikant, im Gegensatz zu den Unterschieden, die sich bei den synchronen Kulturen ergaben.
Untersucht man den Prozentsatz an pre-pulse Initiationsfiguren, die während des zweiten Pulses verschmelzen, so findet man in der frühen S-Phase 3 von 55 (5,5 %), in der mittleren S-Phase 10 von 68 (14,7 %) und in der späten S-

Phase 10 von 53 (18,9 %). Wie bei den synchronen Kulturen nimmt damit der Prozentsatz der nicht auswertbaren Einheiten zu, so daß die Replikationsgeschwindigkeit unterschätzt wird. Es ist noch festzustellen, daß sich unter den nicht in die Rechnungen einbezogenen Autoradiogrammen auch Replikationseinheiten befanden, denen der zweite Puls "fehlte", wobei ungeklärt bleibt, ob es sich um sehr schnell replizierende Replikons handelt oder um solche mit Haltepunkten. Alle diese Faktoren, die schwer quantitativ zu erfassen sind, machen die Interpretation schwierig. Obwohl bei den auswertbaren Replikationseinheiten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Replikationsgeschwindigkeit in verschiedenen Abschnitten der S-Phase festzustellen sind, deuten die schon erwähnten Befunde darauf hin, daß besonders die gefundenen Werte in der mittleren und späten S-Phase als zu niedrig anzusehen sind.

Tab. 8: Replikationsgeschwindigkeit (R) in verschiedenen Abschnitten der S-Phase in vivo und Standardabweichungen (SD)

Abschnitt der S-Phase	R [µm/min x Gabel]	SD [µm/min x Gabel]
Frühe S-Phase (n=110)	1,20	0,51
Mittlere S-Phase (n=136)	1,19	0,43
Späte S-Phase (n=106)	1,18	0,48

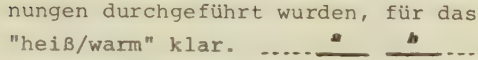
Die Wachstumsgeschwindigkeiten in allen Abschnitten der S-Phase in vivo unterscheiden sich signifikant von denjenigen der teilweise synchronen in vitro Kulturen ($P = 0{,}001$), derjenigen asynchroner Dauerkulturen ($P = 0{,}001$) und derjenigen asynchroner Kulturen ohne 5-Fluordesoxyuridin ($P = 0{,}001$). Ob diese Unterschiede echt sind oder nur auf

die zu langen Pulszeiten bei der Markierungstechnik in vitro zurückzuführen sind, müßte durch Verkürzen der entsprechenden Pulszeiten festzustellen sein.
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterscheiden sich von anderen, bei denen beträchtliche Variationen der Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase festgestellt wurde. Housman und Huberman (7) fanden bei CHO-Zellen, die sie durch Aufheben eines Colcemid-Blockes synchronisiert hatten, je nach Versuchsanordnung eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit auf das 2,5 bis 2,8-fache der Ausgangswerte. Die Autoren erhalten durch den Block zwar einen anfänglichen Mitose-Index von über 90 % und in der darauf folgenden S-Phase einen maximalen Markierungsindex von etwa 95 %, nehmen aber dafür die teilweise beträchtlichen Nebenwirkungen von Colcemid in Kauf. Es ist bekannt, daß bei verschiedenen Zellarten Chromosomenanomalien nach Colcemid-Behandlung auftreten (38,39) und der Eintritt in die Interphase verzögert sein kann (46). An stationären Kulturen von Mäuse-Embryo-Zellen kann sogar die DNA-Synthese durch eine 5 bis 8-stündige Inkubation mit Colcemid wieder in Gang gebracht werden (40). Es ist daher denkbar, daß es auch einige charakteristische Parameter der DNA-Replikation beeinflußt.
In Untersuchungen an HeLa-Zellen, die durch die Mitosen-Selektions-Technik ohne die Verwendung von Colcemid oder eines anderen Mitose-Inhibitors synchronisiert wurden (41), konnte gezeigt werden, daß sich die Kettenwachstumsgeschwindigkeit innerhalb der S-Phase verdreifacht. Die Gesamtsyntheserate steigt sogar um das Fünffache an. Der anfangs erreichte Mitose-Index von 50 % weist auf einen sehr viel besseren Synchronitätsgrad der Zellen im Vergleich zu den in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten in vitro Kulturen hin, bei denen der Mitose-Index nur ca. 10 % betrug. Dagegen müßten die Untersuchungen an synchronen, in vivo markierten Zellen vergleichbar sein, da der hier gefundene Markierungsindex von 86 % demjenigen von 90 % bei den von Painter und Schäfer untersuchten synchronen HeLa-Zellen entspricht.

Die Bestimmung der Kettenwachstumsgeschwindigkeit mit Hilfe von Sedimentationsanalysen beruht auf der Voraussetzung, daß die Zahl der Initiationen während der Pulsdauer gleich der der Terminationen ist. In den Untersuchungen von Painter und Schaefer (4) nimmt aber die Kettenwachstumsgeschwindigkeit in der frühen S-Phase bei einer Verkürzung der Markierungsdauer von 30 auf 10 min um 40 % ab, während in der späten S-Phase die Werte für beide Pulszeiten übereinstimmen. Das weist darauf hin, daß die oben genannte Voraussetzung in der frühen S-Phase nicht zutrifft. Es ist daher möglich, daß die Änderung der Replikationsgeschwindigkeit nicht wie angegeben 100 bis 200 % beträgt, sondern viel kleiner ist und eher den in diesen Untersuchungen für teilweise synchrone Kulturen entspricht. Die vorliegenden Versuchsergebnisse an in vivo markierten und dann selektionierten Zellen, bei denen keine signifikanten Unterschiede in den Replikationsgeschwindigkeiten im Verlauf der S-Phase gefunden wurden, lassen sich durch diese Überlegungen jedoch nicht erklären.

3.2.2.4 Variationen der Replikationsgeschwindigkeit innerhalb einer Replikationseinheit und in benachbarten Einheiten

Die Replikationsgeschwindigkeit einzelner Einheiten variiert innerhalb einer einzelnen Versuchsanordnung beträchtlich, wie man an den relativ großen Standardabweichungen sehen kann. Nach Hand (5) und McFarlane und Callan (6) wird angenommen, daß es Gruppen benachbarter Replikationseinheiten gibt, innerhalb derer die Replikationsgeschwindigkeit annähernd gleich sein soll. Um dieses an den verwendeten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen zu überprüfen, wurden nach einem von Hand vorgeschlagenem Schema die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Gabeln einer Replikationseinheit und diejenigen von benachbarten Einheiten auf eine even-

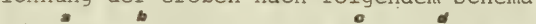
tuelle Korrelation überprüft. Das nachfolgende Schema macht die Beziehung der einzelnen Größen, mit denen die Berechnungen durchgeführt wurden, für das Markierungsschema "heiß/warm" klar. 

Es wurden die Regressionsgeraden der Geschwindigkeit in den beiden Gabeln einer Einheit (a gegen b, c gegen d) und benachbarter Einheiten (a gegen c, a gegen d, b gegen c, b gegen d) und der jeweilige Korrelationskoeffizient r berechnet. Diese sind mit dem zugehörigen Signifikanzniveau in Tab. 9 zusammengefaßt.

Die Korrelationskoeffizienten der Wachstumsgeschwindigkeiten innerhalb derselben Replikationseinheit entsprechen mit Werten zwischen 0,39 und 0,71 in etwa dem bei Hand angegebenen von r = 0,6 (P = 0,01). Die Korrelationskoeffizienten der Replikationsgeschwindigkeiten benachbarter Einheiten sind außer bei den Dauerkulturen kleiner als die vergleichbaren Werte bei Hand (5) (a/c: r = 0,527, a/d: r = 0,498, b/c: r = 0,619, b/d: r = 0,593). Diese Unterschiede könnte man eventuell dadurch erklären, daß bei Hand unter der Wirkung von 5-Fluordesoxyuridin Synchronisationseffekte bei der Initiation aufgetreten sein könnten, wie das bei anderen Zellarten nachgewiesen wurde (3). Bei den vorliegenden Versuchen fehlte diese Synchronität der Initiation teilweise, so daß häufig post-pulse neben pre-pulse Autoradiogrammen auftraten, die für diese Untersuchungen nicht verwertbar sind. Die geringere Anzahl der auswertbaren Paare führt in den Rechnungen zu den kleinen Korrelationskoeffizienten, manchmal zu negativen Werten (s. Tab. 9).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei den Ehrlich-Aszites-Tumorzellen die Geschwindigkeiten der Gabeln innerhalb einer Replikationseinheit gut korreliert sind. Mit zunehmender Entfernung der replizierenden Gabeln innerhalb eines Clusters nehmen die Korrelationskoeffizienten und damit das Ausmaß der Koordination ab. Die Auffassung, daß solche Cluster regulative Einheiten sind, wird unter diesen Gesichtspunkten durch die vorliegenden Ergebnisse nur mit Einschränkungen bestätigt.

Tab. 9: Korrelationskoeffizienten (r) zwischen den Replikationsgeschwindigkeiten der beiden Gabeln eines Replikons und den Gabeln zweier benachbarter Einheiten.
Bezeichnung der Größen nach folgendem Schema für das Markierungsschema "heiß/warm":

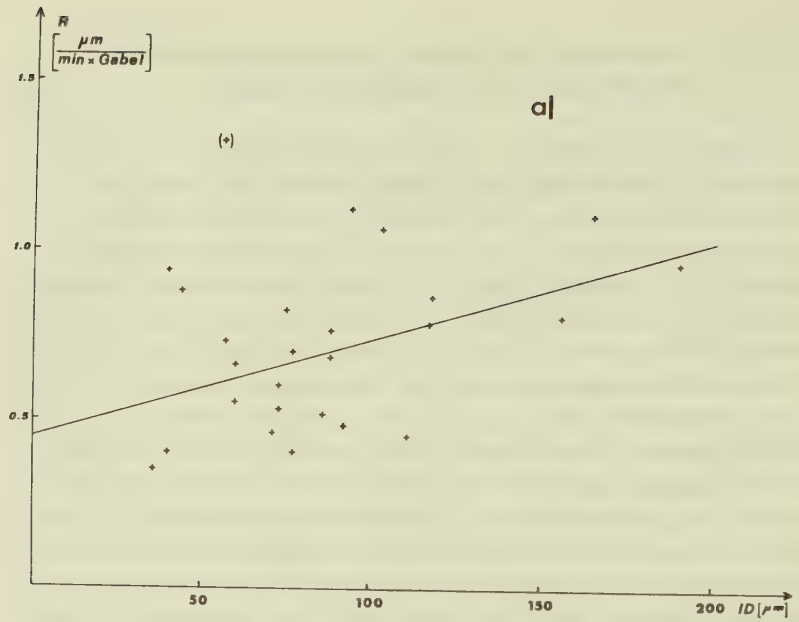


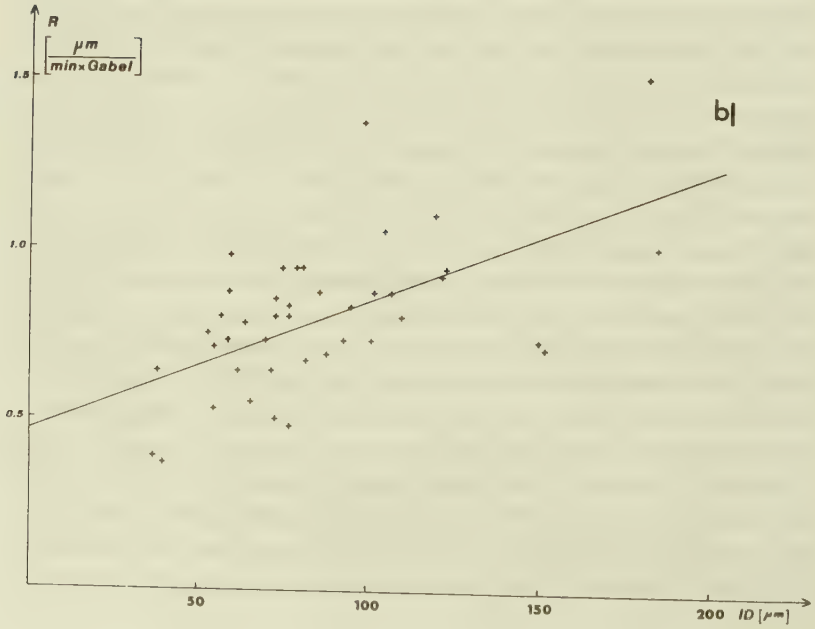
Bei signifikanten Werten ist das Signifikanzniveau von der Nullhypothese mit angegeben (Student's t-Test).

Population	n	r a/b u. c/d	n	r a/c	r a/d	r b/c	r b/d
Asynchron 1. Passage mit FdUrd	60	0,59 (P=0,0001)	29	0,40 (P=0,05)	0,17	0,44 (P=0,02)	0,29
Asynchron 37. Passage	83	0,39 (P=0,001)	24	0,71 (P=0,001)	0,57 (P=0,001)	0,77 (P=0,0001)	0,72 (P=0,0001)
Synchrone Kulturen(in vitro)	117	0,45 (P=0,0001)	38	0,09	0,14	0,38 (P=0,02)	0,30
Frühe S	44	0,49	16	0,42	0,43	0,55	0,68
Mittlere S	51	0,44	15	0,039	0,11	0,56	0,39
Späte S	25	0,51	7	0,40	0,03	0,29	0,63
Synchrone Kulturen (in vivo)	154	0,68 (P=0,0001)	46	0,21	0,18	0,22	0,26
Frühe S	54	0,69	18	0,29	0,26	0,45	0,31
Mittlere S	49	0,63	13	0,30	0,43	0,48	0,60
Späte S	51	0,71	15	0,09	-0,15	-0,22	0,02

3.2.2.5 Variation der Replikationsgeschwindigkeit mit der Größe der Replikationseinheit

Da sowohl die Größe der Replikationseinheiten als auch die Replikationsgeschwindigkeit große Streuungen aufweisen, liegt die Idee nahe, daß zwischen diesen beiden Größen eine Beziehung besteht, so daß große Replikationseinheiten mit großer Geschwindigkeit und kleine mit kleiner Geschwindigkeit repliziert werden. Um den Zusammenhang zwischen den beiden Größen untersuchen zu können, muß man sich klar machen, daß bei den vorliegenden Untersuchungen die Interinitiationsabstände als Maß für die Größe der Einheiten bestimmt wurde. Dieser Abstand setzt sich aber aus je einer Hälfte zweier benachbarter Einheiten zusammen. Deswegen wurde zur Berechnung der Korrelationskoeffizienten und der Regressionsgeraden die Replikationsgeschwindigkeit als mittlere Fortbewegungsgeschwindigkeit der vier Gabeln zweier benachbarter Replikons bestimmt. Abb. 12 zeigt die Regressionsgeraden für die Beziehung zwischen den beiden Größen für die Dauerkultur, synchrone Kulturen und synchrone, in vivo markierte Zellen. In den beiden letzten Berechnungen sind die Werte aus allen Abschnitten der S-Phase zusammengefaßt.
Die Achsenabschnitte, Steigungen der Regressionsgeraden sowie die Korrelationskoeffizienten sind aus Tab. 10 zu entnehmen.
Bei asynchronen Zellen in der 1. Passage mit 5-Fluordesoxyuridin ergab sich kein Zusammenhang, bei denjenigen ohne FdUrd war eine Auswertung nicht möglich, weil die Zahl von zwei benachbarten post-pulse Initiationsfiguren zu gering war. Auch die geringe Anzahl der Werte bei den übrigen Versuchen läßt sich auf dieselbe Ursache zurückführen. Trotzdem weisen die Korrelationskoeffizienten zwischen 0,44 und 0,58 auf eine relativ gute Korrelation der beiden Größen hin. Alle Korrelationskoeffizienten sind signifikant ($P = 0{,}05$, $0{,}001$, $0{,}01$). Die Unterschiede der Regressionskoeffizienten sind bei der Dauerkultur und der syn-


R
[µm / min x Gabel]
1.5
1.0
0.5
a|
(+)
50
100
150
200
ID [µm]


R
[µm / min x Gabel]
1.5
1.0
0.5
b|
50
100
150
200
ID [µm]

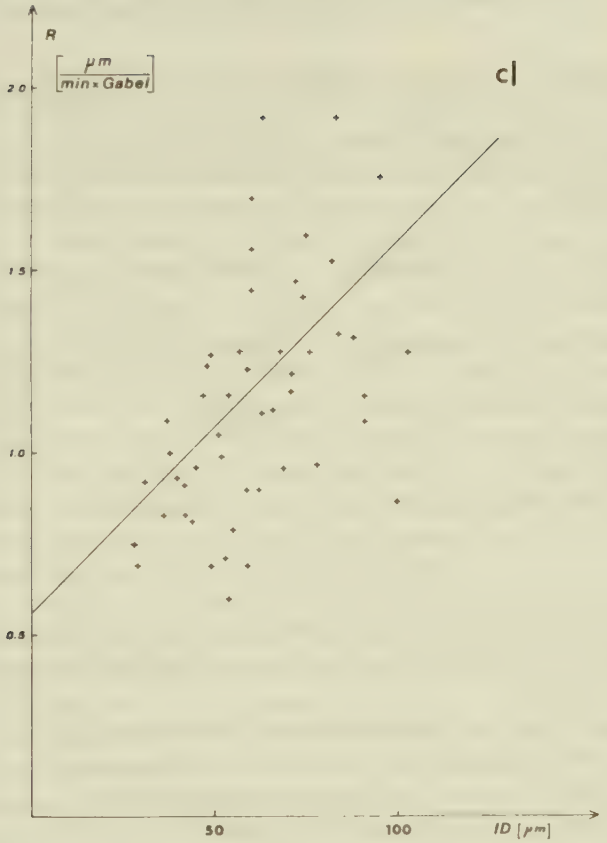


Abb. 12: Korrelation zwischen der Größe (ID) und der Replikationsgeschwindigkeit (R) einer Einheit.
a) 37. Passage Dauerkultur, n = 25, r = 0,47
b) synchrone Kulturen, Werte aus allen Abschnitten der S-Phase, n = 42, r = 0,58
c) synchrone, in vivo markierte Zellen, Werte aus allen Abschnitten der S-Phase, n = 49, r = 0,44
Weitere Erklärungen siehe Text, Achsenabschnitte und Steigungen Tab. 10.

Tab. 10: Beziehung zwischen Replikationsgeschwindigkeit und Größe der Replikationseinheit

Wachstumsbedingung	Achsenabschnitt a	Steigung b	Korrelationskoeffizient r
Asynchrone Dauerkultur (N = 25)	0,45±0,05	0,0028±0,001	0,47 (P = 0,05)
Synchrone Kultur (N = 42)	0,48±0,03	0,0037±0,001	0,58 (P = 0,001)
Synchron in vivo	0,57±0,06	0,0103±0,003	0,44 (P = 0,01)
Asynchron, 1. Passage mit FdUrd (n = 29)	0,72	0,0002	0,02

chronen Kultur nicht signifikant, wohl aber diejenigen bei synchronen, in vivo markierten Zellen und den beiden Kulturen (P = 0,02).

Es besteht also bei Dauerkulturen, synchronen Kulturen und in vivo ein Zusammenhang zwischen der Größe der Replikationseinheit und der Replikationsgeschwindigkeit, wie auch von anderen Autoren festgestellt wurde (3,5). Hand (5) und Okey und Saffhill (3) fanden auch eine Korrelation dieser beiden Größen bei Zellen, die mit 5-Fluordesoxyuridin inkubiert wurden. Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen dieser Zusammenhang unter Fluordesoxyuridin nicht besteht. Es liegen zwar nur wenig Werte insgesamt vor (n = 29), aber eine ähnlich kleine Anzahl bei Dauerkulturen (n = 26) reicht aus, um eine schwach signifikante Korrelation nachzuweisen. Fluordesoxyuridin scheint bei den verwendeten Zellen die Korrelation zwischen Replikationsgeschwindigkeit und Replikongröße aufzuheben.

3.2.3 Synchronität der Initiation in Gruppen benachbarter Replikationseinheiten

Aus der Definition eines Clusters geht hervor, daß eines seiner wesentlichen Merkmale durch die Synchronität der Initiation benachbarter Einheiten gegeben ist. Es wird jedoch ebenso klar, daß Synchronität immer in Beziehung zu anderen zellulären Parametern gesehen werden muß, z.B. zur Dauer der S-Phase oder anderen Zellzykluszeiten. Die Synchronität der Initiation in verschiedenen Zellarten zu vergleichen, ist eigentlich nur dann sinnvoll, wenn die zellkinetischen Daten in etwa übereinstimmen. Die meisten Autoren beziehen das Ausmaß der Synchronität aber auf eine bestimmte Markierungsdauer (3,5), ohne weitere Angaben zu machen. Eine andere Schwierigkeit beim Vergleich entsteht dadurch, daß sie als Kriterium für eine Synchronität der Initiation die Gleichheit zweier benachbarter Initiationsmuster, entweder zwei pre-pulse oder zwei post-pulse Einheiten, oder deren Ungleichheit, eine pre-pulse und eine post-pulse Einheit, verwenden. Bei dem in den vorliegenden Untersuchungen meistens verwendeten "warm/heiß" Markierungsschema läßt sich der Anfang des warmen Pulses meistens nicht genau erfassen. Es wurden daher die Lücken benachbarter pre-pulse-Einheiten ausgemessen, die Differenz gebildet und über die Replikationsgeschwindigkeit auf die Zeit umgerechnet. Zum Vergleich wurden dieselben Zeitgrenzen gesetzt wie in der Literatur. Bei den in vivo markierten Zellen wurde der Pulsabstand von 15 min als Synchronitätsgrenze gesetzt.
Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengefaßt.
Innerhalb eines Zeitraums von 10 min beginnen demnach durchschnittlich 60 % der Replikationseinheiten eines Clusters mit der DNA-Synthese, innerhalb von 30 min 92 % bis 98 %. Der Synchronitätsgrad der Initiation bei Zellen in vivo ist etwas schlechter, durchschnittlich 67 %, als bei Zellen in vitro mit durchschnittlich 78 % innerhalb von 15 min.
Die von Hand (5) angegebenen Werte sind 80 % innerhalb von

10 min und 85 % innerhalb von 30 min bei L929-Mäusezellen. Die besseren Werte für die Grenze von 10 min im Vergleich zu den vorliegenden Versuchen kann man durch den Synchronisationseffekt von FdUrd erklären, das zur Erhöhung des Einbaus eingesetzt wurde, wie Ockey und Saffhill (3) an 3T3-Mäuse- und HeLa-Zellen nachgewiesen haben. Ein statistischer Test der hier vorliegenden Daten wurde wegen der zu komplizierten Auswertungsmethode nicht durchgeführt.

Tab. 11: Synchronität der Initiation: Prozentsatz der Replikompaare, bei denen die Initiation innerhalb des angegebenen Zeitraums stattgefunden hat.

Art der Zellpopulation	Synchronitätsgrad der Initiation bei 10 min	15 min	30 min
Asynchrone Dauerkultur; 8 Std. nach Neueinsaat	63,7 %	78,4 %	95,1 %
Synchrone Zellen in vitro markiert			
Frühe S-Phase	55,3 %	73,7 %	92,1 %
Mittlere S-Phase	58,2 %	80,9 %	98,2 %
Späte S-Phase	60,0 %	70,0 %	96,3 %
Synchrone Zellen in vivo markiert			
Frühe S-Phase	-	63,3 %	-
Mittlere S-Phase	-	69,6 %	-
Späte S-Phase	-	68,1 %	-

3.2.4 Sollhaltepunkte

Schon im ursprünglichen Modell von Huberman und Riggs (1) wurde die Existenz von Sollhaltepunkten vorgeschlagen. Die meisten Untersuchungen, die zu ihrem Nachweis durchgeführt wurden, gingen davon aus, daß solche Sollhaltepunkte asymmetrische Autoradiogramme verursachen müssen. Für den Fall des Markierungsschemas "heiß/warm" sind die Autoradiogramme, die durch Sollhaltepunkte verursacht werden können, im folgenden Schema dargestellt.

I = Initiationspunkt

S = Sollhaltepunkt

Die Auswertung bei den vorliegenden Untersuchungen wurde durch die Umkehrung des Markierungsschemas erschwert und dadurch, daß bei den in vitro Versuchen der größte Teil der Replikationseinheiten verschmolzen war. Die Verschmelzung selbst spricht nicht unbedingt gegen die Existenz von Sollhaltepunkte, die auch nach einer gewissen Wartezeit stattgefunden haben könnte. Andererseits wurde auch eine Anzahl von pre-pulse Initiationsfiguren gefunden, die asymmetrisch in Bezug auf die von den Gabeln zurückgelegten Strecken waren. Entweder war bei diesen die Geschwindigkeit in den Replikonhälften unterschiedlich, oder es existieren Sollhaltepunkte.
Eine klare Unterscheidung beider Möglichkeiten ist theoretisch durch das Verhältnis der beiden Strecken gegeben, die eine Replikationsgabel während des warmen und des heißen Pulses zurückgelegt hat. Bei Erreichen eines Sollhaltepunktes wird das Verhältnis ungleich eins sein. In der Praxis ist diese Auswertungsmethode nicht durchführbar, da der Beginn der schwach markierten Strecken meistens nicht genau festzustellen ist.

Daher wurde die Frage nach der Existenz von Sollhaltepunkten unter der Annahme folgender Hypothese bearbeitet: Die Wahrscheinlichkeit, daß eine der beiden Gabeln einer Replikationseinheit an einem (hypothetischen) Sollhaltepunkt aufgehalten wird, während die andere noch weiterläuft, müßte umso größer sein, je mehr Zeit seit der Initiation dieses Replikons verstrichen ist. Das bedeutet aber, daß die Differenz zwischen den von den beiden Gabeln einer Einheit zurückgelegten Strecken mit der Zeit zunimmt. Es wurde daher für jede Replikationseinheit die Differenz der stark markierten Strecken beider Hälften in Minuten umgerechnet, wobei die Replikationsgeschwindigkeit der längeren Hälfte als eigentliche Replikationsgeschwindigkeit angenommen wurde. Eine Auftragung dieser Differenz gegen die Zeit, die seit der Initiation der betreffenden Einheit vergangen war, zeigt für alle Versuchsbedingungen keinerlei Korrelation. Unter den oben genannten Voraussetzungen ist daher die Existenz von Sollhaltepunkten auszuschließen.

Dieses Ergebnis deckt sich mit denen anderer Autoren (5,6). Ein logisches Argument von Blumenthal et al. (10) spricht ebenso wie die Untersuchungen dieser Autoren an embryonalen und Kulturzellen von Drosophila gegen die Existenz solcher Haltepunkte:
"Wenn es solche Terminationssequenzen gäbe, müßten Inversionen, Translokationen und Deletionen häufig dazu führen, daß zwischen zwei benachbarten Terminationspunkten eine Initiationssequenz fehlt. Man müßte erwarten, daß eine solche Situation letal ist, da die DNA zwischen den Terminationspunkten nicht repliziert werden könnte und sich als Folge davon die Tochterchromosomen nicht ohne Bruch trennen könnten."
Die Beseitigung solcher Schädigungen würde in jedem Fall ein Reparatursystem voraussetzen. Der Aufwand für den zellulären Stoffwechsel wäre beträchtlich, so daß die Existenz von Sollhaltepunkten auch aus diesem Grund unwahrscheinlich ist.

3.3 Modell der DNA-Replikation bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen

Das Modell für die DNA-Replikation bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, das sich aus den vorliegenden Untersuchungen ergibt, soll in seinen Einzelheiten noch einmal zusammenfassend dargestellt werden.

Die Verdopplung der DNA erfolgt abschnittsweise in Replikationseinheiten, deren Größe durch den Abstand zweier benachbarter Initiationspunkte gegeben ist. Die Verteilungen der Größe dieser Replikationseinheiten sind schiefe Verteilungen und lassen sich in guter Wirkung als logarithmische Normalverteilungen beschreiben. Die Medianwerte variieren zwischen 53,6 µm bei asynchronen Dauerkulturen und 76,7 µm bei Zellen in der 1. Passage.

Andere Autoren geben die Mittelwerte an, unter der Voraussetzung, daß eine Normalverteilung vorliegt. Die von Hand und Tamm für L292-Mäusefibroblasten angegebenen Werte betragen 45,4 µm $\pm$ 1,19 (2) bis 57,2 µm (5), Ockey und Saffhill (3) fanden für 3T3-Mäusefibroblasten mit 5-Fluordesoxyuridin 53,99 $\pm$ 2,58 µm, ohne FdUrd 84,16 $\pm$ 4,14 µm. Zum Vergleich sind die in diesen Versuchen gefundenen Mittelwerte unter Voraussetzung einer Normalverteilung in Tab. 12 zusammengefaßt. Sie variieren zwischen 61,2 $\pm$ 18,3 und 77,2 $\pm$ 33,5 µm und stimmen damit mit den von anderen Autoren gefundenen Werten recht gut überein.

Die Unterschiede in der Verteilungen der Interinitiationsabstände, die gefunden wurden, waren statistisch nur schwach signifikant (P = 0,05, zweiseitiger Test nach Kolmogoroff und Smirnoff). Daher ist anzunehmen, daß es sich eher um zufällige als systematische Unterschiede handelt.

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Replikongröße und der Dauer der S-Phase feststellen. Die Interinitiationsabstände bei in vivo gehaltenen Zellen, die in allen untersuchten Zellpopulationen die längste S-Phase haben, sind nicht größer als diejenigen von Zellen unter anderen Wachstumsbedingungen. Auch innerhalb der S-Phase bleibt

Tab. 12: Interinitiationsabstände unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und in verschiedenen Abschnitten der S-Phase: Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichungen SD unter Voraussetzung einer Normalverteilung.

	n	Mittelwert $\bar{x}$ µm	SD µm
Asynchron			
1. Passage mit FdUrd			
10 min Puls	31	66,9	21,1
30 min Puls	50	71,9	19,3
37.Passage			
4 Std. nach Einsaat	19	65,9	37,3
8 Std. nach Einsaat	133	62,2	32,2
Synchrone Kulturen			
Frühe S-Phase	45	72,2	33,5
Mittlere S-Phase	97	64,9	20,4
Späte S-Phase	95	66,0	26,8
Synchron in vivo			
Frühe S-Phase	52	66,5	25,7
Mittlere S-Phase	62	61,2	18,3
Späte S-Phase	58	62,6	20,8

diese Größe relativ konstant, sowohl in vivo als auch in vitro. Daher kann man durch die vorliegenden Untersuchungen ausschließen, daß eine Änderung der Gesamtgeschwindigkeit der DNA-Synthese über eine Änderung der Abstände zwischen den Initiationspunkten erfolgt. Das steht in Einklang mit den Untersuchungen an CHO-Zellen (7), bei denen im Verlauf der S-Phase auch keine Änderungen der Interinitiationsabstände gefunden wurden.

Die Replikationsgeschwindigkeit, d.h. die Fortbewegungsgeschwindigkeit einer Replikationsgabel, erwies sich in den vorliegenden Untersuchungen nicht als konstante Größe. Die kleinsten Werte betrugen 0,50 $\pm$ 0,13 µm/min x Gabel bei Kul-

turen, die mit 5-Fluordesoxyuridin behandelt wurden. Repräsentativ für die Replikationsgeschwindigkeit von Kulturzellen dürfte ein Wert von 0,7 - 0,8 µm/min x Gabel sein (siehe Dauerkultur, 10 Min.-Werte bei Kulturen mit Fluordesoxyuridin und synchrone Kulturen). Diese Werte stimmen mit denen anderer Autoren überein, die für L929-Mäusefibroblasten 0,6 - 0,72 µm/min x Gabel fanden (18,42).
Ockey und Saffhill fanden für 3T3-Mäusefibroblasten eine Replikationsgeschwindigkeit von 1,06 ± 0,03 µm/min x Gabel, die unter dem Einfluß von 4×10^{-2} M FdUrd auf 0,72 ± 0,04 µm/min x Gabel absank. Der Einfluß von 5-Fluordesoxyuridin auf die Replikationsgeschwindigkeit bei den in diesen Versuchen verwendeten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen ist nicht so eindeutig und bewirkt erst nach längerer Inkubationsdauer eine Herabsetzung dieser Größe.
Eine der Hauptfragestellungen dieser Arbeit bestand darin, die Replikationsgeschwindigkeit im Verlauf der S-Phase zu untersuchen. Diese Untersuchungen sind aber von der Güte einer Synchronisationsmethode in hohem Grade abhängig.

In dieser Arbeit kommen zwei unterschiedliche Prinzipien zur Anwendung, die beide auf der Selektion synchroner Unterpopulationen aus einem in vivo angezüchteten Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus beruhen (14). Einerseits wurden mit solchen Subpopulationen Kulturen angelegt, die,wie in (16) gezeigt wurde, aus dem jeweiligen Zellzyklusstadium heraus weiterwachsen können. Durch die natürliche Streuung der einzelnen Zellzyklusphasen verliert sich dabei die anfängliche Synchronität mit zunehmender Dauer des Wachstums in der Kultur. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Markierungen etwa ein Zellzyklus nach der Etablierung der Kultur vorgenommen. Wie sich zeigte, war zu diesem Zeitpunkt die Synchronität bereits recht unbefriedigend. Durch das zweite Prinzip kann dieser Nachteil vermieden werden: Die Markierung erfolgt ohne Eingriffe in das natürliche Milieu in vivo. Nach der Auftrennung im Zonal-Rotor stehen die einzelnen Subpopulationen mit ihrem ursprünglichen Synchroni-

tätsgrad zur weiteren Analyse zur Verfügung, wie auch die impulszytofluorometrische Charakterisierung verschiedener S-Phase-Stadien ergab.

Die Versuche an synchronen Kulturen und an synchronen, in vivo markierten Zellen unterscheiden sich in signifikanter Weise. Die Replikationsgeschwindigkeit nimmt im Verlauf der S-Phase in vitro von 0,75 µm/min x Gabel auf 0,91 µm/min x Gabel zu ($P = 0,01$). In vivo ist sie mit Werten zwischen 1,13 und 1,20 µm/min x Gabel konstant und außerdem signifikant größer als in vitro. Neue, vorläufige Ergebnisse aus unserem Labor weisen darauf hin, daß die kleineren Werte in vitro nicht dadurch bedingt sind, daß die Verschmelzung der einzelnen Replikationseinheiten während der langen Markierungsdauer eine wesentliche Unterschätzung der Replikationsgeschwindigkeit bewirkt. Bei 10-min-Pulsen wurden unter Bedingungen, die mit denen der vorliegenden Versuche vergleichbar sind, bei asynchronen Kulturen Werte um 0,6 µm/min x Gabel gefunden (43). Der Unterschied der Replikationsgeschwindigkeit unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, d.i. in vivo und vitro, ist also mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch eine Abweichung in den Markierungsschemata bedingt.

Wie aber kann man die Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit im Verlauf der in vitro S-Phase erklären, die auch von anderen Autoren an CHO- und HeLa-Zellen (7,8) gefunden wurden? Eine einfache Erklärung ist die, daß die angewendeten Synchronisationsverfahren die DNA-Synthese so beeinflussen, daß zu Beginn der auf die Synchronisation folgende S-Phase die Replikationsgeschwindigkeit ihren maximalen Wert noch nicht erreicht. Einen ähnlichen Effekt konnte man auch bei Dauerkulturen beobachten, die 4 Std. nach der Einsaat langsamer replizierten als 8 Std. nach der Einsaat.

Dagegen wurden bei den vorliegenden Untersuchungen an Zellen in der Peritonealhöhle von Versuchstieren außer der Markierungsprozedur keine Eingriffe vorgenommen. Die nachträgliche Selektion im Zonenrotor hat keinerlei Einfluß auf den Thymidin-Einbau, der zu diesem Zeitpunkt abgeschlos-

sen ist. Da die Replikationsgeschwindigkeit in vivo bei gleicher Länge der Replikationseinheiten etwa doppelt so groß ist wie in vitro, trotz der wesentlich längeren S-Phase, muß man annehmen, daß die Kulturbedingungen die Verhältnisse in vivo nur unzureichend wiedergeben.
Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit bestand darin, die Regulation der DNA-Synthese auf subchromosomaler Ebene zu untersuchen. Den Untersuchungen lag die Modellvorstellung von Clustern benachbarter Replikationseinheiten als regulative Einheiten zugrunde, die von mehreren Autoren entwickelt wurde (2,3,5,6,10). Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wurden solche Gruppen benachbarter Replikationseinheiten gefunden, die folgende Eigenschaften zeigten:

1) Die Größe der einzelnen Einheiten innerhalb einer Gruppe ist ähnlich. Die Korrelationskoeffizienten für die Beziehung zwischen den Logarithmen zweier benachbarter Interinitiationsabstände sind statistisch signifikant auf dem Niveau von 1 % bzw. 0,1 %. Hand (5) gibt für den Korrelationskoeffizienten der Interinitiationsabstände selbst r = 0,39 (P = 0,05) an, die in dieser Arbeit gefundenen Werte sind im Vergleich dazu r = 0,44 bis 0,75 (P = 0,01 - 0,001).
2) Die Fortbewegungsgeschwindigkeiten der beiden Gabeln einer Replikationseinheit sind in etwa gleich. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind signifikant (P = 0,001 bis 0,0001). Die Korrelation zwischen den Replikationsgeschwindigkeiten zweier benachbarter Einheiten ist nur bei den Dauerkulturen mit Korrelationskoeffizienten von 0,57 - 0,77 mit den Angaben von Hand (5) vergleichbar, der Werte von r zwischen 0,45 und 0,57 (P = 0,01) angibt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen die Replikationsgeschwindigkeit eher auf der Ebene der einzelnen Replikationseinheit als auf der von Clustern reguliert wird.
3) In benachbarten Einheiten erfolgt die Initiation etwa gleichzeitig: 60 % benachbarter Paare initiieren inner-

halb eines Zeitraums von 10 Min., durchschnittlich 95 % innerhalb von 30 Minuten. Diese Werte entsprechen denen von Hand (5), der für L929-Mäusefibroblasten einen Synchronitätsgrad von 85 % innerhalb von 30 Min. ($P < 0{,}005$) fand. Ockey und Saffhill (3) fanden zudem, daß der Synchronitätsgrad bei 15 min Pulsdauer für 3T3-Mäusefibroblasten durch 4×10^{-7} M FUdrd von 48 % auf 62 % angehoben wurde. Beide Autoren machen keine Angaben über die Zellzyklusdaten der von ihnen verwendeten Zellen. Aus diesen beiden Gründen kann man ihre Ergebnisse nicht direkt mit denen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit vergleichen.

4) Zwischen den Replikationseinheiten ließen sich keine Sollhaltepunkte nachweisen. Wie auch bei anderen Autoren (5,6) beruhen die Untersuchungen auf der Annahme, daß die Initiation nicht nur genau in der Mitte einer Einheit erfolgen kann, sondern auch für daneben liegende Punkte eine gewisse Initiationswahrscheinlichkeit gegeben ist. Unter dieser Voraussetzung konnte bei den vorliegenden Untersuchungen die Existenz von Sollhaltepunkten nicht nachgewiesen werden.
5) Zwischen der Replikationsgeschwindigkeit und der Größe einer Einheit besteht eine Korrelation. Je größer ein Replikon ist, desto größer ist die Fortbewegungsgeschwindigkeit der beiden Gabeln. Dieser Zusammenhang wurde auch von anderen Autoren gefunden.

Die DNA-Synthese bei Eukaryonten ist ein aus vielen Einzelschritten zusammengesetzter Vorgang. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Vorgang auf der Ebene der einzelnen Replikationseinheit und auf der von Gruppen solcher Einheiten untersucht. Die Gesamtsyntheserate der DNA ist nach diesen Untersuchungen von der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Gabeln innerhalb der einzelnen Einheiten abhängig und davon, wieviele Cluster von Replikons zu dem betreffenden Zeitpunkt gerade aktiviert sind. Die Größe der einzelnen Replikationseinheit ist unter allen Wachstumsbedingungen relativ konstant.

Die vorliegenden Untersuchungen können aber keinen endgültigen Aufschluß darüber geben, welche Regulationsmechanismen die Änderung der einzelnen Größen bewirken, die die Gesamt-DNA-Syntheserate bestimmen. Durch faserautoradiographische Methoden allein wird sich dieser Fragenkomplex wohl auch beantworten lassen. Dagegen lassen solche Messungen bei allen der Methodik anhaftenden Unsicherheiten eine außerordentlich direkte und voraussetzungsfreie Erfassung einzelner Parameter zu. Dadurch kann die Relevanz von Ergebnissen,die mit anderen Methoden erhalten wurden, durch die vorliegenden Befunde beurteilt werden. Ein Beispiel dafür sind die im hiesigen Labor durchgeführten Untersuchungen an demselben Zellmaterial über die Bindung radioaktiver Marker in neu synthetisierter DNA an Nitrozellulose (44,45). Die Ergebnisse solcher Versuche erwiesen sich mit den vorliegenden Befunden im Rahmen der Genauigkeit beider Methoden als gut vereinbar. So ließ sich bei der statistischen Durchrechnung von vereinfachten mathematischen Modellen des Replikationsablaufs eine optimale Anpassung der theoretischen Werte an die experimentell gefundenen erzielen, wenn eine Geschwindigkeit der Replikationsgabel von 0,69 µm/min x Gabel (in dieser Arbeit für in vitro Kulturen etwa 0,7 - 0,8 µm/min x Gabel) und eine mittlere Entfernung der Initiationspunkte von 79,4 µm (in dieser Arbeit etwa 60 - 70 µm) angenommen wurde (12).

4. Zusammenfassung

Die Organisation der DNA-Replikation in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen wurde durch faserautoradiographische Methoden untersucht. Das Modell, das sich daraus ableiten läßt, hat folgende Eigenschaften:

1) Der Abstand der Initiationspunkte folgt in guter Näherung einer logarithmischen Normalverteilung. Die Medianwerte betragen je nach den Wachstumsbedingungen der Zelle 53,6 bis 76,7 µm. Die Größe der Replikationseinheiten ändert sich im Verlauf der S-Phase weder in vitro noch in vivo in statistisch signifikanter Weise.
2) Die Replikationsgeschwindigkeit asynchroner Zellen beträgt in vitro 0,59 bis 0,75 µm/min x Gabel in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen. Im Verlauf der S-Phase bei synchronen Kulturen nimmt sie von 0,75 auf 0,91 µm/min x Gabel zu, während sie im Verlauf der S-Phase in vivo mit Werten zwischen 1,13 und 1,20 µm/min x Gabel keine statistisch signifikante Änderung zeigt. Die Replikationsgeschwindigkeit in vivo ist jedoch im Vergleich zu derjenigen von Kulturzellen erhöht.
3) Es läßt sich eine Korrelation zwischen der Größe und der Replikationsgeschwindigkeit einer Replikationseinheit feststellen. Die Geschwindigkeit der Gabeln ist umso größer, je größer die Replikationseinheit ist.
4) Die Regulation der DNA-Synthese erfolgt auf der Ebene von Gruppen benachbarter Replikationseinheiten (Cluster). Diese bestehen aus Einheiten ähnlicher Größe. Es besteht nicht nur eine Korrelation zwischen den Geschwindigkeiten der Gabeln einer Einheit, sondern teilweise auch zwischen denen benachbarter Einheiten. Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt innerhalb eines Clusters zu etwa demselben Zeitpunkt.
5) Es ergaben sich keine Hinweise auf eine feste Begrenzung der einzelnen Replikationseinheiten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Modellrechnungen über den Replikationsablauf bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, die auf unabhängigen Untersuchungsmethoden basieren, im Rahmen der Genauigkeit beider Methoden überein.

5. Literaturverzeichnis

1. Huberman, J.A., Riggs, A.D. (1968); J. Mol. Biol. 32, 327-341

2. Hand, R., Tamm, I. (1974); J. Mol. Biol. 82, 175-183

3. Ockey, C.H., Saffhill, R. (1976); Exp. Cell Res. 103, 361-373

4. Painter, R., Schaefer, A.W. (1969); J. Mol. Biol. 45, 467-479

5. Hand. R. (1975); J. Cell Biol. 64, 89-97

6. McFarlane, P.W., Callan, H.G. (1973); J. Cell Sci. 13, 821-839

7. Housman, D., Huberman, J.A. (1975); J. Mol. Biol. 94, 173-181

8. Painter, R., Schaefer, A.W. (1971); J. Mol. Biol. 58, 289-295

9. Taylor, J.H., Hozier, J.C. (1976); Chromosoma (Berl.) 57, 341-350

10. Blumenthal, A.B., Kriegstein, H.J., Hogness, D.S. (1974) Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 38, 205-223

11. Wolstenholme, D.R. (1973); Chromosoma (Berl.) 43, 1-18

12. Fraterman, A. (1978); Inauguraldissertation, Universität Tübingen

13. Karzel, K. (1965); Med. Pharmacol. Exp. 12, 137-146

14. Probst, H., Maisenbacher, J. (1973); Exptl. Cell Res. 78, 335-344

15. Schindler, R., Day, M., Fischer, A. (1959); Cancer Res. 19, 47-51

16. Maisenbacher, J. (1973); Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen

17. Paul, J. (1965); Cell and Tissue Culture, Livingstone; Edinburgh; London, S. 83, 304

18. Hand, R., Tamm, I. (1973); J. Cell Biol. 58, 410-418

19. Probst, H., Maisenbacher, J. (1975); in: Methods in Cell Biology, Herausgeber D. Prescott, New York, Bd. 12, 173-184

20. Wurster, U. (1970); Diplomarbeit, Universität Tübingen

21. Schindler, R., Ramseier, L., Schaer, J.C., Grieder, A. (1970); Exptl. Cell Res. 59, 90-96

22. Blütters, R. (1974); Diplomarbeit, Universität Tübingen

23. Rajewsky, M.F., Grüneisen, A., Rimmer, J. (1972) Studia Biophysica 31/32, 347-367

24. Scholz, D. (1973); Diplomarbeit, Universität Tübingen

25. Huberman, J.A., Tsai, A. (1973); J. Mol. Biol. 75, 5-12

26. Van't Hoff, J. (1976); Exptl. Cell Res. 103, 395-403

27. Amaldi, F., Buongiorno-Nardelli, M., Carnevali, F., Leoni, L., Mariotti, D., Pomponi, M. (1973); Exptl. Cell Res. 80, 79-87

28. Amaldi, F., Carnevali, F., Leoni, L., Mariotti, D. (1972); Exptl. Cell Res. 74, 367-374

29. Hand, R., German, J. (1975); Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 758-762

30. Hori, T., Lark, K. (1973); J. Mol. Biol. 77, 391-404

31. Petes, T.D., Farber, R.A., Tarrant, G.M., Holliday, R. (1974); Nature 251, 434-436

32. Probst, H., unveröffentlicht

33. Chan, A.C., Walker, I.G. (1975); Biochim. Biophys. Acta 395, 422-432

34. Ockey, C.H. (1972); Exptl. Cell Res. 70, 203-213

35. Okumura, Y., Onozawa, M., Morita, T. (1973); Exptl. Cell Res. 78, 233-236

36. Shackney, S.E., Ford, S.S., Wittig, A.B. (1973); Cancer Res. 33, 2726-2731

37. Sachs, L. (1972); Statistische Auswertungsmethoden, 3. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York; S. 82, 86-89, 228-230

38. Comings, D.E. (1971); Exptl. Cell Res. 67, 441-460

39. Gaffney, E.V., McElwain, E.G. (1973); In vitro 9, 56-63

40. Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., Guelstein, V.I. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 977-979

41. Terasima, T., Tolmach, L.J. (1963); Exptl. Cell Res. 30, 344-362

42. Hand, R. (1976); Virology 71, 609-614

43. Fielitz, J., unveröffentlicht

44. Stumpf, Ch. (1977); Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen

45. Probst, H., Ullrich, A., Krauss, G. (1971); Biochim. Biophys. Acta 254, 15-29

46. Gaffney, E.V. (1975); in: Methods in Cell Biology, Herausgeber D. Prescott, New York, Bd. 9, 71-84

Lebenslauf

Ich, Renate Blütters, wurde am 29. März 1949 als Tochter des Franz Blütters und seiner Ehefrau Anna, geb. Bongers, in Schwerte/Ruhr geboren.
Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Westhofen/Ruhr, anschließend die Hildegardis-Schule in Hagen, ein Neusprachliches Mädchengymnasium, an der ich am 4. Juli 1967 das Abitur ablegte.
Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der Universität Tübingen das Studium der Biochemie, das ich am 30. August 1974 mit der Diplomhauptprüfung abschloß.
Im Wintersemester 1974/75 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Fach Humanmedizin. Im März 1976 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab, im März 1977 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Seit Oktober 1974 arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Probst am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen an der vorliegenden Dissertation "DNA-Replikation in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen: Faserautoradiographische Untersuchungen", die ich im Wintersemester 1977/78 abschloß.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	:	G. Weitzel, U. Weser, H. Probst
Organische Chemie	:	E. Müller, E. Bayer, H. Hagenmaier
Anorganische Chemie	:	W. Rüdorff, E. Stumpp, J. Gelinek
Physikalische Chemie	:	H. Mauser
Mathematik	:	W. Schweizer
Physik	:	H. Krüger, H. Kleinpoppen
Botanik	:	E. Bünning
Zoologie	:	F.-P. Möhres, E. Schwartz
Mikrobiologie	:	H. Zähner
Anatomie	:	W. Graumann, K. Mörike, M. Arnold
Physiologie	:	E. Betz, R. Jacob
Pharmakologie	:	H. Remmer, M. Siess, K.-F. Sewing

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/6 4321